

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Luciana Madureira de Araujo Lowndes Vieira

**COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DO ENSAIO DA MEMBRANA
CORIOALANTÓIDE DE OVO EMBRIONADO DE GALINHA (HET-CAM) PELA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE OCULAR DE SUBSTÂNCIAS
QUÍMICAS**

Rio de Janeiro

2020

Luciana Madureira de Araujo Lowndes Vieira

**COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DO ENSAIO DA MEMBRANA
CORIOALANTÓIDE DE OVO EMBRIONADO DE GALINHA (HET-CAM) PELA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE OCULAR DE SUBSTÂNCIAS
QUÍMICAS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dra. Maria Helena S. V. Boas
Dr. Octavio Augusto F. Presgrave

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Vieira, Luciana Madureira de Araujo Lowndes

Comparação dos diferentes protocolos do ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) pela avaliação do potencial irritante ocular de substâncias químicas. / Luciana Madureira de Araujo Lowndes Vieira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

94 f. : il. ; fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadora: Maria Helena Simões Villas Boas.

Co-orientador: Octávio Augusto França Presgrave.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. HET-CAM. 2. Hen's Egg Test. 3. Método alternativo. 4. Irritação ocular. 5. Estratégia bottom-up. I. Título.

Comparison of the different protocols of the chicken embryonic egg choroidal membrane test (HET-CAM) by the evaluation of the ocular irritating potential of chemical substances.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Luciana Madureira de Araujo Lowndes Vieira

**COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DO ENSAIO DA MEMBRANA
CORIOALANTÓIDE DE OVO EMBRIONADO DE GALINHA (HET-CAM) PELA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE OCULAR DE SUBSTÂNCIAS
QUÍMICAS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 22/06/2020.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz

Dra Carolina Bárbara Nogueira de Oliveira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Gutemberg Gomes Alves
Universidade Federal Fluminense

ORIENTADORES

Dra. Maria Helena Simões Villas Boas
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Octavio Augusto França Presgrave
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, a todos os Orixás e meu Anjo da Guarda que iluminaram o meu coração com força e coragem para superar todas as dificuldades.

Aos meus pais pela dedicação e amor, são meus exemplos de vida.

Ao meu marido e filhos, com muito amor, carinho e gratidão. Sem vocês minha vida não teria sentido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que iluminou e guiou meus passos, em sua infinita sabedoria.

A Jesus Cristo, meu guia espiritual, anjo da guarda, e todos os espíritos de luz que habitam meus pensamentos, me protegem, auxiliam e orientam em boas escolhas.

A meus pais, que sempre estiveram me abençoando em suas orações e nas minhas jornadas, além de sempre incentivarem meus estudos.

A meu marido, Alcemir e filhos, Lucas e Maria Rita, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por me alegrar nos momentos de estresse e dificuldades.

Aos meus orientadores Dra. Maria Helena Simões Villas Boas e Dr. Octavio Augusto França Presgrave, pelos valiosos ensinamentos e entusiasmo com a pesquisa.

Ao amigo Ronald Silva, pela inestimável ajuda durante a realização deste estudo e por dividir comigo seu conhecimento.

Aos queridos amigos de laboratório, João Carlos (Profeta), Renata Nundes, Izabela Gimenes, Carolina Bárbara, Cristiane Caldeira, Débora Vieira, Clarice Abreu e Edimilson Souza pela força, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos deste trabalho.

A Dra. Helena Pereira da Silva Zamith pela colaboração como revisora desta dissertação.

A coordenação do curso e aos professores que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) é um método alternativo válido utilizado para avaliação do potencial irritante ocular de produtos químicos. O olho é uma estrutura complexa, sujeito a vários tipos de efeitos adversos, portanto, o HET-CAM é um método importante, pois fornece dados relacionados a eventos vasculares, incluindo hiperemia, hemorragia e coagulação. Esse método é o único que mimetiza a conjuntiva do olho, e tem por objetivo avaliar semiquantitativamente o potencial irritante de um produto químico sobre a membrana corioalantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha por meio da observação dos efeitos irritantes sobre a membrana imediatamente após a aplicação do produto químico puro ou diluído. No presente estudo foi realizado um levantamento no banco de dados do Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) de produtos e substâncias químicas analisados pelo teste de Draize, sendo esse considerado o padrão ouro. Em seguida, foi feita uma comparação entre os dois protocolos do HET-CAM, protocolo francês (Journal Officiel de la Republique Française), e protocolo alemão (protocolo nº. 47 INVITTOX), utilizando nove tensoativos e suas diferentes concentrações, anteriormente testados pelo teste de Draize. Essa comparação demonstrou que tanto o protocolo francês quanto o protocolo alemão foram capazes de identificar corretamente todos os tensoativos classificados como irritantes pelo teste de Draize. Também ficou claro que o teste HET-CAM tende a superestimar os resultados quando comparado ao modelo *in vivo*, porém ele é capaz de identificar com precisão os produtos não irritantes sendo um ótimo candidato para compor uma estratégia de teste *Bottom-up*. Para suprir algumas necessidades foi realizada a otimização do protocolo francês gerando um protocolo adaptado, reduzindo a subjetividade na avaliação do teste garantindo resultados mais precisos e um maior controle da qualidade. Os resultados obtidos demonstram que o protocolo adaptado é um bom candidato a método alternativo para uma estratégia *Bottom-up* e altamente sensível e confiável para identificar todos os ingredientes e produtos não irritantes.

Palavras-chave: HET-CAM. Método alternativo. Irritação ocular. Estratégia *bottom-up*.

ABSTRACT

The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) is a valid alternative method used to assess the eye irritating potential of chemicals. The eye is a complex structure and subject to several types of adverse effects, therefore, HET-CAM is an important method, as it provides data related to vascular events, including hyperemia, hemorrhage and coagulation. This assay is the only one that mimics the conjunctiva of the eye, and aims to semiquantitatively evaluate the irritating potential of a chemical product on the embryonic egg choroidal membrane (CAM) by observing the irritating effects on it-immediately after the application of the pure or diluted chemical. In the present study, a survey was carried out in the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) database of products and chemicals analyzed in the Draize test, which is considered as a Gold Standard test. Then, it was made a comparison between two HET-CAM protocols, French protocol (Journal Officiel de la République Française), and German protocol (protocol N° 47 INVITTOX), using the nine surfactants found, in their different concentrations, totaling twenty two samples. This comparison demonstrated that both French and German protocols were able to correctly identify all surfactants classified as irritants in the alternative methods. It was also clear that HET-CAM test tends to overestimate the results when compared to the Draize test, however it is able to accurately identify non-irritating products and is a great candidate for composing a Bottom-up test strategy. To meet some needs, we optimized the French protocol by generating an adapted protocol, reducing subjectivity in the test evaluation, ensuring more accurate results and greater quality control. The results obtained demonstrate that the adapted protocol is a good candidate for an alternative method for a Bottom-up strategy and highly sensitive and reliable to identify all non-irritating ingredients and products.

Keywords: HET-CAM. Alternative method. Eye irritation. Bottom-up strategy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diagrama esquemático do olho humano.....	21
Figura 2	Estruturas acessórias do olho humano.....	22
Figura 3	Cartaz divulgado pelo FDA no ano de 1933 alertando sobre o risco associado ao uso de produto cosmético (Lash Lure®).....	23
Figura 4	John H. Draize, farmacologista do FDA que desenvolveu o teste de irritação ocular de Draize em 1944.....	24
Figura 5	Teste de Draize para determinação do potencial de irritação ocular...	25
Figura 6	Evolução das lesões oculares no teste de Draize.....	26
Figura 7	Estratégia <i>Bottom-Up</i> (de baixo para cima) e <i>Top-Down</i> (de cima para baixo).....	33
Quadro 1	Métodos alternativos reconhecidos nas resoluções normativas do CONCEA.....	38
Quadro 2	Teste HET-CAM: Relação dos tensoativos, fabricante e CAS (<i>Chemical Abstracts Service</i>).....	44
Figura 8	Incubadora de ovos empregados no teste HET-CAM.....	46
Figura 9	Teste HET-CAM: Ovo embrionado com a membrana da casca exposta.....	47
Figura 10	Teste HET-CAM: Ovo embrionado e materiais utilizados.....	48
Figura 11	Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM).....	49
Quadro 3	Gradação das alterações observadas na membrana cório-alantoide do ovo embrionado de galinha no teste HET-CAM.....	50
Figura 12	Membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.....	51
Figura 13	Membrana corioalantóide – Coagulação.....	51
Quadro 4	Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.....	52
Figura 14	Equipamentos utilizados na realização do teste HET-CAM segundo protocolo nº47 INVITTOX.....	53
Figura 15	Registro da filmagem da membrana corioalantóide durante o teste HET-CAM segundo protocolo nº 47 INVITOX com aumento de 7x.....	54

Quadro 5	Parâmetros para classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.....	55
Quadro 6	Diferenças de cada protocolo no ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)	62
Quadro 7	Diferenças metodológicas – teste HET-CAM.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados dos testes de irritação ocular pelo teste de Draize, HET-CAM protocolo francês e HET-CAM protocolo alemão.....	58
Tabela 2	Resultados dos testes de irritação ocular pelo teste de Draize e HET-CAM protocolo adaptado.....	59
Tabela 3	Tabela de Contingência dos testes de Draize e HET-CAM protocolo francês.....	60
Tabela 4	Tabela de contingência dos testes de Draize e HET-CAM protocolo alemão.....	60
Tabela 5	Tabela de Contingência dos testes de Draize e HET-CAM protocolo adaptado.....	61
Tabela 6	Comparação de todos os resultados da tabela de contingência pela aplicação dos testes de Draize, HET-CAM protocolo alemão, HET-CAM protocolo francês e HET-CAM protocolo adaptado.....	61
Tabela 7	Resultados dos testes de irritação ocular pelo teste de Draize, HET-CAM protocolo francês, HET-CAM protocolo alemão e HET-CAM protocolo adaptado.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs	<i>Replacement, Reduction and Refinement</i> (Substituição, Redução e refinamento)
ANVS	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	<i>Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay</i> (Teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina)
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
CAM	Membrana corioalantóide
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i> (Serviço de Resumos Químicos)
CCT	Comissão de Ciência e Tecnologia
CEUA	Comissões de Ética no Uso de Animais
CIUCA	Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
DL ₅₀	Dose Letal Média
EC	<i>European Community</i> (Comunidade Européia)
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos)
EEC	<i>European Economic Community</i> (Comunidade Econômica Européia)
EU	<i>European Union</i> (União Europeia)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane</i> (Ensaio da membrana CORIOALANTÓIDE de ovo embrionado de galinha)
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i> (Comitê de Coordenação Interinstitucional para a Validação de Métodos Alternativos)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IL	Irritante Leve
IM	Irritante Moderado

IS	Irritante Severo
ES	Escore de irritação
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i> (Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais)
JRC	<i>European Commission's Joint Research Centre</i> (Centro de Pesquisa da Comissão Europeia)
LCCDM	Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
MCTIC	Ministério da Ciência Tecnologia Inovação e Comunicações
mL	Mililitro
MTT	Ensaio da atividade metabólica mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
NI	Não Irritante
NIEHS	<i>National Institute of Environmental Health Sciences</i> (Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental)
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (Instituto Nacional de Saúde)
NRU	<i>Neutral Red Uptake</i> (Captação de vermelho neutro)
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
PLC	Projeto de Lei da Câmara
PNVS	Política Nacional de Vigilância em Saúde
POP	Procedimento Operacional Padronizado
P/V	Peso por volume
RBC	<i>Red Blood Cell</i> (Glóbulos vermelhos)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RN	Resolução Normativa
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i> (Comitê Científico de Segurança do Consumidor)
SDS	Solução de dodecilsulfato de sódio
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
TH	<i>Threshold Concentration</i> (Concentração limite)

<i>USDA</i>	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
UV	Radiação ultravioleta
VISA	Vigilância Sanitária
μl	Microlitros
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Vigilância sanitária	15
1.2 Controle da qualidade de produtos	18
1.3 Anatomia e morfologia do olho humano	20
1.4 Teste de irritação ocular	22
1.5 Métodos alternativos	26
1.5.1 Métodos alternativos para irritação ocular.....	30
1.6 Histórico das normas nacionais e internacionais acerca da experimentação animal e uso de métodos alternativos	33
1.7 HET-CAM	40
1.8 Justificativa	41
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos	43
3 METODOLOGIA	44
3.1 Levantamento dos produtos e substâncias químicas analisados no Setor de Irritação	44
3.2 Tensoativos	44
3.3 Teste de Draize	45
3.4 HET-CAM	45
3.4.1 Ovos.....	45
3.4.2 HET-CAM – protocolo francês.....	48
3.4.3 HET-CAM – protocolo alemão.....	52
3.4.4 HET-CAM – protocolo adaptado.....	56
3.5 Análise estatística	56
4 RESULTADOS	58
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	68
7 PRODUTO TECNOLÓGICO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A – ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR – TESTE DE DRAIZE	80
APÊNDICE A - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO: ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR – MÉTODO HET-CAM	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vigilância sanitária

Na história das civilizações, a saúde era considerada essencial à dignidade humana, povos antigos estabeleceram regras sobre a conduta dos profissionais que tratavam de doenças. Em 300 a.C. uma lei proibiu a adulteração de alimentos, medicamentos e perfumes na Índia. Desde a Antiguidade até a Idade Média se desenvolveram ações que nortearam a evolução de conceitos até que, em 1348, as medidas estabelecidas em Veneza para impedir a entrada de epidemias nas cidades deram início à vigilância dos portos, estabelecendo-se a inspeção das embarcações e o regime de quarentena para seus passageiros. No século XVIII surgiram as estatísticas populacionais e o conceito de polícia médica como base para a intervenção na saúde do povo, visando uma população grande, bem cuidada e controlada para aumentar o poder e a riqueza nacionais (DA SILVA, 2000).

O episódio da talidomida constituiu-se num marco para a história da regulamentação sanitária em todo o mundo. Logo após esse trágico acontecimento, criaram-se órgãos nacionais de controle e se publicou farta legislação para se garantir a segurança dos produtos. Passando a ser comum em países desenvolvidos, a responsabilidade dos fabricantes pela qualidade dos produtos oferecidos ao mercado e monitoramento dos efeitos adversos, principalmente de medicamentos (DA SILVA, 2000).

No Brasil, a história do controle sanitário se inicia no século XVI, seguindo o modelo adotado em Portugal, onde era enfatizada a regulamentação dos ofícios de cirurgião e boticário. As Câmaras Municipais eram responsáveis pelas medidas de higiene pública, tais como limpeza urbana, água e esgoto, controle portuário, abate de animais, comércio de alimentos, entre outros. Com a chegada da Família Real ao Brasil, em 1808, o cuidado da saúde da população foi intensificado, aumentando o controle sanitário com caráter fiscalizador, julgador e punitivo, visando evitar as doenças epidêmicas, assim criando condições para aceitação dos produtos brasileiros no mercado internacional, adquirindo uma nova imagem frente à Europa (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Foi a partir da criação do Ministério da Saúde (MS) em 1953 por meio da Lei nº 1.920, de 25 de julho de 1953, que o controle sanitário foi realmente instituído no Brasil. O Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM) foi

criado em 1954 e em 1961 passou a se chamar Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA). A partir daí muitas regulamentações foram criadas e modificadas, até a promulgação da Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976, denominada a Lei de Vigilância Sanitária, que foi regulamentada por meio do Decreto nº 79.094, de 05 de janeiro de 1977. Em 1981, o LCCDMA passou para a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), tendo seu nome modificado para Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Na década de 1990 podem ser citados grandes marcos normativos como: a Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, que estabeleceu normas de proteção e defesa do consumidor; a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990 que organizou o Sistema Único de Saúde (SUS); a Portaria nº 1.565, de 26 de agosto de 1994, que definiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS); a Portaria nº 1.428, de 26 de novembro de 1993, que aprovou diretrizes e regulamentos para a vigilância de alimentos (BRASIL, 1990a; 1990b; 1993; 1994) No final da década de 90 por meio da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVS), mais tarde adotando a sigla Anvisa, com a finalidade de “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária (Visa) inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras” (BRASIL, 1999).

A Visa tem por objetivo a promoção, proteção, recuperação e a reabilitação da saúde, sendo assim atua sobre diversos fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, ambiente, transportes, cargas e pessoas. Para essa atuação tão diversificada, a Visa se vale de uma multidisciplinaridade que envolve diversas áreas do conhecimento técnico-científico que inclui a química, a farmacologia, a engenharia civil, a epidemiologia, a biossegurança e a bioética, entre outras (COSTA; ROZENFELD, 2000).

A Lei nº 8.080/1990, define Visa como sendo “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990a).

A criação da Anvisa impôs novos desafios ao SNVS, levando o INCQS a ter um papel mais efetivo como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços (DA SILVA, 2000).

O Decreto nº 8.932, de 14 de dezembro de 2016, no artigo 24 regulamenta o Estatuto da Fiocruz estabelecendo que “ao INCQS compete planejar, coordenar, supervisionar e executar atividades de: i. controle da qualidade de serviços, ambientes e produtos de interesse para saúde; ii. participação na política de elaboração de normas e no desenvolvimento de metodologias de controle da qualidade em saúde; iii. desenvolvimento do ensino e da formação de recursos humanos em sua área de competência para o sistema de saúde, ciência e tecnologia do País; iv. promoção de ações regulatórias em parceria com os entes do SNVS e os outros órgãos competentes; v. assessoria técnica, como unidade de referência, à rede nacional de laboratórios de controle de qualidade em saúde; vi. promoção e manutenção de intercâmbio e cooperação mútua, em sua área de competência com instituições nacionais, estrangeiras e internacionais; e vii. realização de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação em suas áreas de competência para o sistema de saúde e de ciência e tecnologia da Fiocruz” (BRASIL, 2016).

Assim, para o cumprimento de seu papel no âmbito do SNVS, o INCQS realiza as análises laboratoriais previstas na legislação sanitária somente para o poder público, principalmente por denúncias e por programas com instituições do SNVS. Entre as ações de Visa está a realização de análises analítico-laboratoriais, que têm como objetivo principal fornecer subsídios aos órgãos competentes para elucidar dúvidas quanto a desvios dos padrões de qualidade dos produtos (INCQS, 2009).

Recentemente foi instituída a Política Nacional de Vigilância em Saúde (PNVS) aprovado por meio da Resolução nº 588, de 12 de julho de 2018. As discussões para a consolidação da PNVS mobilizaram diversos entes sociais e o documento final é resultado da 1ª Conferência Nacional de Vigilância em Saúde. A PNVS tem como uma de suas diretrizes abranger ações voltadas à saúde pública, com intervenções individuais ou coletivas, prestadas por serviços de Visa, Vigilância epidemiológica, Vigilância em saúde ambiental e Vigilância em saúde do trabalhador, em todos os pontos de atenção, sendo assim abrange o INCQS na medida em que estabelece “ações de monitoramento da qualidade e segurança dos bens, produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária”, sob a responsabilidade direta da Anvisa (BRASIL, 2018).

1.2 Controle da qualidade de produtos

A avaliação da eficácia, qualidade e segurança tornaram-se progressivamente mais intensas, atingindo de forma muito especial os produtos cosméticos, bem como os medicamentos e produtos afins, e deve preceder a inserção de um produto no mercado. Para cumprir este propósito, o modelo animal é o mais utilizado e requerido nos processos investigativos (BRASIL, 1976; 2013)

As autoridades governamentais, no cumprimento de suas atribuições, atuam não apenas como órgãos fiscalizadores, mas essencialmente normativos. Assim promovem debates que culminam em legislação onde normaliza-se as substâncias químicas que podem ser utilizadas, bem como os testes requeridos para cada produto especificamente (BRASIL, 1976; 2013).

Atualmente, a legislação define produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (BRASIL, 2015a).

Os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes estão sujeitos ao controle da Visa e são classificados conforme o grau de risco à saúde: Grau I (produtos de notificação), que se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requeiram informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto; e Grau II (produto com registro), cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso. Os critérios para esta classificação foram definidos em função da probabilidade de ocorrência de efeitos não desejados devido ao uso inadequado do produto, sua formulação, finalidade de uso, áreas do corpo a que se destinam e cuidados a serem observados quando de sua utilização (BRASIL, 2015a).

A Anvisa é o órgão federal responsável por estabelecer as normas para o registro (autorização de comercialização), fabricação, rotulagem e venda desses produtos, enquanto aos órgãos regionais e municipais de Visa cabe a responsabilidade pela execução da fiscalização na cadeia produtiva, desde

a fabricação até a comercialização, avaliando as técnicas e os métodos empregados na fabricação desses produtos. Compete ainda aos órgãos de VISA, o monitoramento e a divulgação de informações sobre a segurança de produtos cosméticos, de higiene pessoal e perfumes, assegurando ao consumidor a aquisição de produtos eficazes, seguros e de qualidade (BRASIL, 2012b).

A avaliação de segurança dos ingredientes utilizados em formulações cosméticas deve seguir rigoroso delineamento científico para uma formulação segura, devendo seguir os parâmetros: 1) Caracterização é necessária à disponibilização dos dados descritos na Portaria nº 295, 16 de abril de 1998 (BRASIL, 1998b); 2) Aplicação cosmética, função e finalidade, concentração de uso indicada pelo fornecedor, restrições regulamentares de uso, entre outros usos; 3) Dados toxicológicos, relacionados à natureza físico-química do ingrediente e à metodologia de avaliação utilizada (via de administração, tempo e frequência de exposição, entre outros) (BRASIL, 2012b).

O *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) tem indicado a realização dos seguintes ensaios pré-clínicos: toxicidade sistêmica aguda; corrosividade e irritação dérmica; sensibilização cutânea; absorção/penetração cutânea; toxicidade em doses repetidas; mutagenicidade/genotoxicidade; toxicidade sub-aguda e subcrônica; irritação ocular; irritação de mucosas; efeitos tóxicos induzidos pela radiação ultravioleta (UV) (fototoxicidade, fotogenotoxicidade, fotoalergia); carcinogenicidade; toxicidade do desenvolvimento e reprodutiva (teratogenicidade); toxicocinética e toxicodinâmica. Os testes de segurança de cosméticos têm por objetivo verificar a ausência de: irritação, sensibilização, fototoxicidade e fotoalergia (BRASIL, 2012b).

Entre os componentes de produtos cosméticos, os tensoativos são componentes importantes e amplamente empregados na formulação de produtos cosméticos e de higiene, como xampus, sabonetes e cremes em geral, devido as suas características de diminuir a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, emulsificação, detergência e outras.

A avaliação do potencial de irritação dos olhos é essencial para garantir a segurança de indivíduos que se expõem a uma ampla variedade de substâncias projetadas para uso industrial, farmacêutico ou cosmético.

1.3 Anatomia e morfologia do olho humano

O olho é o órgão responsável pela visão e, no caso dos seres humanos, possui um diâmetro de aproximadamente 24 milímetros. O globo ocular fica acondicionado dentro de uma cavidade óssea e protegido pelas pálpebras, em seu exterior possui seis músculos que são responsáveis pelos movimentos oculares e três camadas concêntricas aderidas entre si com a função de visão, nutrição e proteção (KELS; GRZYBOWSKI, 2015).

A camada externa é constituída pela córnea, esclera e conjuntiva. A córnea é transparente e avascular, nutrida pelo humor aquoso, composta por cinco camadas e atua como lente convergente. A esclera que é a parte branca do olho funciona como uma camada protetora, pouco vascularizada, fibrosa, densa, branca e opaca. Finalmente, a conjuntiva é uma membrana mucosa que cobre a superfície da esclera exposta (conjuntiva bulbar) e a superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral), contém vasos sanguíneos, nervos, glândulas conjuntivais e células inflamatórias. Como parte da resposta inflamatória na conjuntiva, ocorre dilatação dos vasos sanguíneos, vazamento de fluido e vazamento celular e possui a função de proteção e lubrificação dos olhos (KELS; GRZYBOWSKI, 2015).

A camada média ou úvea é formada pela íris, a coroide e o corpo ciliar. A íris é uma estrutura muscular de cor variável situada à frente do cristalino, que envolve a pupila e regula a intensidade da luz. O corpo ciliar situa-se entre a íris e a coroide, responsável pela produção do humor aquoso, possui musculatura lisa responsável pela acomodação do cristalino e a coroide localizada entre a esclerótica e a retina é responsável por nutrir a retina (KELS; GRZYBOWSKI, 2015).

A camada interna é constituída pela retina que é a parte nervosa, membrana mais interna do olho, onde se encontra o nervo óptico, responsável por enviar os estímulos luminosos ao cérebro.

Existe ainda a pupila que possui uma abertura central, responsável por controlar a entrada de luz; o cristalino que é uma lente que focaliza os raios de luz sobre a retina; os compartimentos oculares, câmara anterior – entre a córnea e a íris e câmara posterior – entre a íris e o cristalino, ambos preenchidos pelo humor aquoso (líquido incolor) e espaço interno – posterior ao cristalino, preenchido pelo humor vítreo (substância gelatinosa) e o nervo óptico que transmite os impulsos gerados pela retina ao cérebro sob forma de imagens (**Figura 1**) (KELS; GRZYBOWSKI, 2015).

Figura 1 - Diagrama esquemático do olho humano.

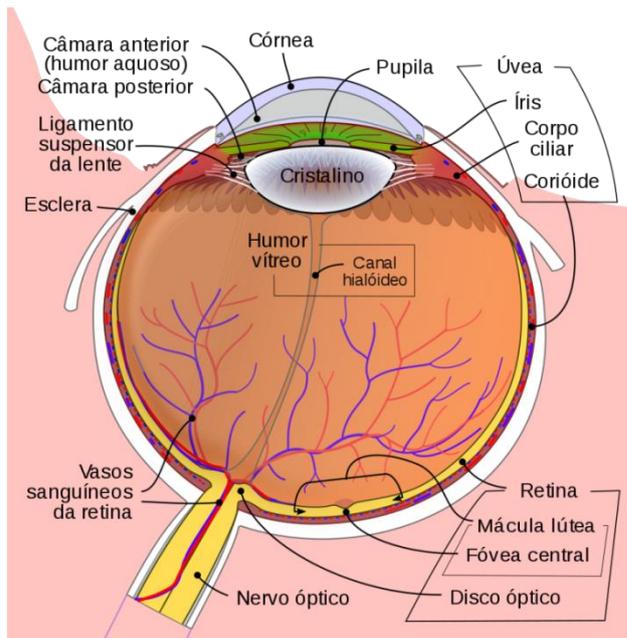


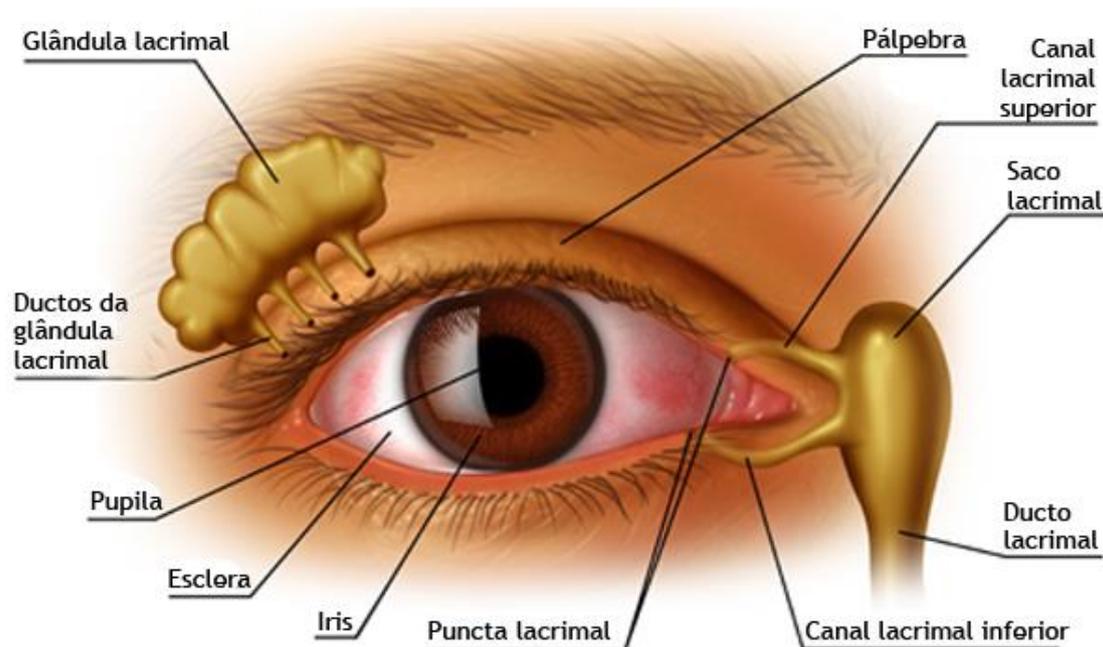
Imagem extraída da página da Wikipédia - A enciclopédia livre.

Fonte: (Disponível em:

https://pt.wikipedia.org/wiki/Olho_humano#/media/Ficheiro:Schematic_diagram_of_the_human_eye_pt.svg). Acesso em: 22 out. 2019.

Os supercílios, as pálpebras, os cílios e o aparelho lacrimal são as chamadas estruturas acessórias do olho, que são indispensáveis. Os supercílios protegem o olho da incidência direta de raios solares ou outros objetos estranhos. As pálpebras trabalham na “segurança” dos olhos durante a noite, enquanto dormimos, para evitar, assim como fazem os supercílios, a incidência excessiva de luz nos olhos, e quando nós piscamos elas ajudam a espalhar substâncias lubrificantes pelos olhos. O aparelho lacrimal engloba as glândulas lacrimais e as vias de drenagem da lágrima para o nariz (**Figura 2**). A lágrima produzida no aparelho lacrimal, além de umedecer, limpa a superfície do olho que está exposta ao ar, isso porque ela contém uma enzima bactericida que evita a contaminação (KELS; GRZYBOWSKI, 2015).

Figura 2 - Estruturas acessórias do olho humano.



Fonte: (Disponível em: <http://www.dracarolinabrandao.com.br/wp-content/uploads/2018/03/estrurura-ocular.jpg>). Acesso em: 22 out. 2019.

1.4 Teste de irritação ocular

A comercialização de uma diversidade de produtos colocava em risco a saúde de consumidores por não serem testados quanto a sua eficácia, até mesmo em países europeus e nos Estados Unidos da América (EUA). Denúncias sobre agravos à saúde associados à utilização de determinados produtos foram se tornando públicas, e com isso a necessidade de um maior controle por parte das agências regulatórias internacionais se tornou evidente. Foi exatamente neste contexto que surgiu em meados da década de 1940, o teste de irritação ocular de Draize (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944).

Um dos marcos históricos relacionados à utilização inadequada de produtos, que foi introduzido no mercado sem antes ter sido devidamente avaliado sob o ponto de vista toxicológico, deixando vítimas, foi à linha de cosméticos Lash Lure® que era aplicada em salões de beleza da época e se apresentava como corantes permanentes para cílios e sobrancelhas. A linha continha em sua formulação parafenilenodiamina, substância com alto potencial dermo-sensibilizante, que causou severa alteração - geralmente bilateral - de córnea em mulheres que fizeram uso destes produtos semanas após tê-los aplicado. Estima-se que os produtos da linha Lash Lure® tenham deixado pelo menos 12 mulheres cegas e causado a morte de uma pessoa na década

de 30 nos EUA (WILHELMUS, 2001). A *Food and Drug Administration* (FDA) divulgou o caso, com cartazes como o ilustrado na **Figura 3**, alertando a população para o risco associado ao uso do produto.

Figura 3 - Cartaz divulgado pelo Food and Drug Administration (FDA) no ano de 1933 alertando sobre o risco associado ao uso de produto cosmético (Lash Lure®)



Nota: O cartaz descreve o mote da campanha do Lash Lure: “Irradie personalidade”, e afirma “esta é a versão do fabricante para os efeitos de seu produto” (com a foto de uma das vítimas do Lash Lure, uma mulher de 38 anos de Ohio, EUA, horas antes de fazer uso do produto). À direita: “Totalmente cega: este foi o verdadeiro efeito de Lash Lure, em pelo menos um dos casos” (com a foto da mesma mulher com severa alteração bilateral de córnea, semanas após ter utilizado o produto).

Fonte: (Imagem extraída da página da US Food and Drug Administration)

Disponível em: <https://www.fda.gov/aboutfda/history/forgshistory/evolvingpowers/ucm054826.htm>

Acesso em: 3 ago. 2018.

A lista de princípios ativos tóxicos presentes em produtos para higiene pessoal e embelezamento era significativa. Há registros da comercialização de produtos como o Berry’s Freck®, uma pomada à base de mercúrio, o Anti-Mole®, um creme anti-sinais contendo 5% de ácido nítrico acrescido de 25% de ácido acético glacial, tônicos capilares como Dr. Denni’s® e Dewsberry® à base de cloreto de cobre e hidrato de cloro, o creme para depilação Koremlu® por Dr. Sabouraud à base de acetato de tálio, composto extremamente tóxico usado como raticida, que causou severos problemas de saúde em suas usuárias como perda generalizada de pelos, cegueira, etc., ou ainda, xampus contendo em suas formulações substâncias hoje sabidamente carcinogênicas como o tetracloreto de carbono (ILAR, 2004, RIORDAN, 2004, COSTA, 2006).

No final da década de 30 eram tantos os casos de agravos à saúde e óbitos induzidos por produtos de uso comum nos EUA, que culminou em uma importante lei *The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* que pela primeira vez na história,

regulamentou os produtos cosméticos e trouxe inovações para o campo de medicamentos, como por exemplo, a exigência de comprovação de eficácia/segurança de novos produtos numa etapa prévia a comercialização. O teste de Draize surgiu como fruto da necessidade detectada naquele momento de se controlar a segurança de produtos cosméticos, antes mesmo de estes entrarem no mercado consumidor (KURIAN,1998).

O teste de Draize foi desenvolvido em 1944 pelo farmacologista John H. Draize (**Figura 4**) do FDA e seus colaboradores, com o propósito de avaliar o potencial tóxico de produtos que pudessem vir a entrar em contato com o olho humano. Esse teste foi preconizado durante muito tempo como procedimento padrão universal para avaliação da irritação ocular e o potencial de risco de substâncias químicas manufaturadas (e.g. cosméticos, fármacos, produtos de uso agrícola e domissanitários, entre outros) (WILHELMUS, 2001).

Figura 4 - John H. Draize, farmacologista do FDA que desenvolveu o teste de irritação ocular de Draize em 1944.



Fonte: (Wilhelmus, 2001).

Ao longo dos anos, o teste sofreu diversas modificações propostas por pesquisadores de todo mundo envolvendo desde o número de animais, quantidade do produto aplicado, tempo de irrigação após aplicação do produto, período de observação, graduação e interpretação dos resultados (WILHELMUS, 2001).

Uma das modificações mais recentes no protocolo da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) do teste de Draize, foi a redução para 1 a 3 animais, dependendo da necessidade ou não de confirmação da resposta à irritação. Outra modificação concentrou-se principalmente no uso de analgésicos sistêmicos e anestésicos tópicos evitando quase toda a dor e angústia do animal sem afetar o resultado do teste. Atualmente os testes em animais só devem ser realizados, caso seja considerado necessário, após a realização de uma estratégia de teste que inclui a realização de métodos alternativos validados disponíveis e uso dos que forem considerados adequados (OECD, 2017a).

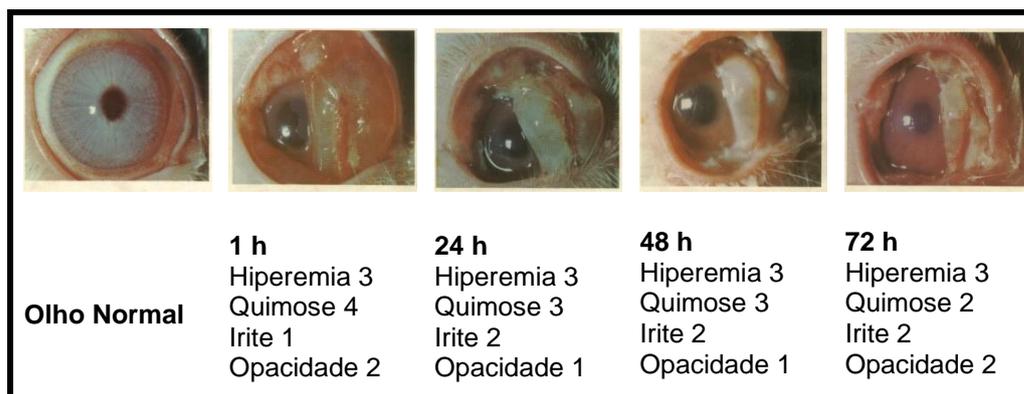
O teste de Draize é um teste realizado em coelhos, que avalia a irritação ocular induzida por medicamentos, cosméticos e outras substâncias químicas. A irritação é avaliada por uma graduação das alterações e lesões causadas por uma determinada substância-teste instilada diretamente no globo ocular de coelhos (**Figura 5**), o outro olho, que permanece sem tratamento, serve como controle. Os olhos devem ser examinados 1, 24, 48 e 72 h após a aplicação da substância-teste, tendo como resultado uma combinação de escores numéricos individuais em períodos subsequentes, como: opacidade de córnea, área total afetada da córnea, inflamação da íris, eritema de conjuntiva, inchaço e secreção (**Figura 6**). O uso de anestésicos tópicos e analgésicos sistêmicos para evitar ou minimizar a dor e a angústia nos procedimentos de testes de segurança ocular é descrito (OECD, 2017a).

Figura 5 - Teste de Draize para a determinação do potencial de irritação ocular.



Exemplo de realização do teste de Draize: A – aplicação do produto; B – observação do olho para avaliação e graduação de possíveis lesões.

Fonte: (Banco de dados do Departamento de Toxicologia e Farmacologia).

Figura 6 - Evolução das lesões oculares no teste de Draize

Graduação das lesões oculares segundo Escala Arbitrária de Draize
(Hiperemia 0 a 3 – Quimose 0 a 4 – Irite 0 a 2 – Opacidade 0 a 4)
(Guia ilustrado para análise de irritação ocular – Prancha FDA)
Fonte: (FDA, 1964).

O teste de Draize é um teste controverso, considerado por alguns como um teste que causa dor e sofrimentos nos animais, assim como, um método que apresenta grandes limitações, sobretudo no que diz respeito às diferenças entre o olho do coelho e o olho humano e à subjetividade de sua resposta. Por esse motivo, é um dos métodos mais combatidos pelos setores de defesa dos Direitos dos Animais e também um dos primeiros ensaios utilizados para fins regulatórios pelo qual se procuraram alternativas (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944, KAY; CALANDRA, 1962).

1.5 Métodos alternativos

O Decreto 6.899/2009 define métodos alternativos como sendo procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por métodos que: não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos *ex vivo*; ou diminuam ou eliminem o desconforto dos animais (BRASIL, 2009).

A busca por métodos alternativos que apresentem vantagens, como maior confiabilidade, redução de custos e maior facilidade de disseminação e incorporação por outros laboratórios é uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade, além de ser uma questão de ética. Assim sendo, os laboratórios de controle da qualidade devem se adequar a esta realidade, procurando desenvolver, implantar e validar métodos alternativos que se mostrem eficientes e úteis ao controle toxicológico de produtos sujeitos à ação da Visa. Neste caso, pode-

se dizer que a indústria química, ou mesmo os órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade estão sob crescente pressão para substituir a experimentação animal por métodos que não utilizem animais na avaliação toxicológica de novos produtos (EUN; SUH, 2000).

Com a tendência mundial de substituição do uso de animais, algumas indústrias internacionais como a de cosméticos, passaram a desenvolver e apresentar resultados de testes *in vitro* para a comprovação da segurança de seus produtos. A maioria dos estudos relacionados ao desenvolvimento de métodos alternativos se concentra na área dos estudos de toxicidade de produtos cosméticos, como por exemplo, os testes de irritação cutânea, irritação ocular, dermo-sensibilização, fototoxicidade, irritação de mucosas, corrosividade cutânea, entre outros (BRASIL, 2012a).

Embora as primeiras ideias remontem a 1760, foi somente com a publicação, por Russel e Burch em 1959, do conceito dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*) que se passou a trabalhar mais arduamente na busca de métodos que não fizessem uso de animais de laboratório. O aumento dos protestos, sobretudo contra a indústria de cosméticos, forçou o desenvolvimento de métodos que visavam à substituição de testes toxicológicos (PRESGRAVE, 2009a).

A substituição é caracterizada pela não utilização de animais. Para tal, é necessário desenvolver métodos alternativos à experimentação animal, tais como ensaios *in vitro*, por exemplo, métodos físico-químicos, culturas de células, entre outros (BALLS, 2009).

A redução pode ser entendida de duas formas: 1) redução do número de animais em um único teste, por exemplo, quando se deixou de usar o teste clássico de Dose Letal Média (DL₅₀) e passou-se a utilizar métodos que necessitam de no máximo dez animais para se obter a mesma classificação toxicológica (Método de Classe, Método de Doses Fixas e *Up-and-Down*); e 2) quando a redução se dá dentro de um processo contínuo, isto é, ao invés de se utilizar animais em todas as fases, seguimos um procedimento de *screening* ou hierarquização de métodos onde, por exemplo, iniciamos a análise pelo pH; se não for considerado corrosivo, segue-se para uma análise usando um Sistema Inteligente, integrado com um método *in vitro*. Dessa maneira, nas primeiras sequências de testes nenhum animal é utilizado e, somente nas fases finais, pode ser necessário o uso de animais, já com a possibilidade de toxicidade bastante reduzida (BALLS, 2009).

A ideia de refinamento implica em implementar cuidados e tratamentos aos animais de forma a minimizar qualquer dor ou sofrimento aos animais que porventura necessitem ser usados. Isto pode ser conseguido: 1) através do uso de anestésicos ou analgésicos, sempre que estes não interfiram nos experimentos (estudos que envolvem dor, o controle negativo não pode receber esses agentes); 2) manutenção dos animais em grupos (quando o desenho experimental não exigir o isolamento, como por exemplo, em estudos de toxicidade reprodutiva); ou 3) aplicação de um programa de enriquecimento ambiental, por exemplo: feno autoclavado para coelhos e cobaias, tubos plásticos para camundongos, etc. (BALLS, 2009).

Foi no final da década de 70, com a pressão exercida na Europa por grupos protecionistas contra o uso de animais pela indústria de cosméticos, que as pesquisas realmente avançaram e a discussão sobre o uso de animais em pesquisa científica tornou-se mais abrangente e consistente (BALLS; STRAUGHAN, 1996, PRESGRAVE, 2009a).

Os métodos alternativos validados são aqueles para os quais a relevância e a confiabilidade estão estabelecidas para um propósito particular, de acordo com critérios estabelecidos (PAUWELS; ROGIERS, 2004). Dessa forma, um método validado é aquele que já passou por estudo colaborativo e tem sua metodologia e seus critérios bem definidos e aceitos oficialmente (PRESGRAVE et al., 2010a).

A validação de métodos alternativos é necessária para que um método possa ser utilizado de forma a atender o seu objetivo garantindo a confiabilidade, a relevância e a robustez para um propósito específico e para a aceitação pelo órgão de regulamentação. De fato, o processo de validação de métodos alternativos visa verificar a otimização, potencial de transferência, reprodutibilidade e relevância do método proposto com o objetivo de ser submetido à apreciação da agência regulatória. A disponibilização mundial dos métodos validados ocorre por meio da OECD e das farmacopeias (PRESGRAVE et al, 2010a).

Existem muitos centros de pesquisa ligados ao conceito dos 3Rs no mundo dedicados à busca e à validação de métodos alternativos. Trata-se de instituições que se dedicam à pesquisa de métodos que venham a substituir, reduzir ou refinar o uso de animais na experimentação (ALTWEB, 2009).

Como exemplo de centros de pesquisa temos: o *European Union Reference Laboratory - European Center for the Validation of Alternative Methods* (EURL-ECVAM), criado em 1991, que faz parte do *European Commission's Joint Research Centre* (JRC), que visa cumprir os requerimentos preconizados na Diretiva

2010/63/EU (EU, 2010). Esta Diretiva estimula o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos que ofereçam o mesmo nível de informação dos métodos em animais disponíveis, mas que reduzam significativamente o número de animais utilizados ou substituam o uso dos mesmos (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1991). Outro Centro, o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) criado em 1994 como um comitê para apresentar o relatório que sustenta os requerimentos do *1993 National Institutes of Health (NIH) Revitalization Act*, no qual o *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS) foi incumbido de estabelecer os critérios para validação e aceitação regulatória de métodos alternativos em toxicologia (ICCVAM, 2008).

No Brasil a Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012, criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) que possui uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados, composta por duas categorias de laboratórios (Laboratórios Centrais e Laboratórios Associados) supervisionada pelo Conselho Diretor, com o objetivo de promover a implementação, o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos ao uso de animais, promover a adoção de métodos alternativos ao uso de animais nas atividades de ensino e pesquisa, estimular a implantação de métodos alternativos ao uso de animais por meio de treinamento técnico e implementação de metodologias validadas, monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados por meio de comparações interlaboratoriais, entre outros (BRASIL, 2012a).

O processo de validação dos métodos alternativos ao uso de animais na experimentação e na educação ocorrerá no âmbito do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) que foi idealizado em 2008 e logo recebeu apoio da comunidade científica, setores produtivos, academia e órgãos internacionais, sendo criado oficialmente em 2013 por meio de Portaria da Direção do INCQS (Portaria nº 29/2013 - INCQS) (PRESGRAVE, 2008, 2009b; PRESGRAVE et al, 2010b)

É de responsabilidade do BraCVAM validar métodos alternativos ao uso de animais na experimentação e na educação. Ao receber uma demanda, o BraCVAM, após análise, encaminhará a solicitação ao Conselho Diretor da RENAMA que identificará quais laboratórios poderão participar e executará o processo de validação. Dentre suas principais atividades estão coordenar estudos para o desenvolvimento de métodos alternativos, coordenar a validação de métodos alternativos, propor e/ou avaliar protocolos de testes, analisar e/ou avaliar os resultados obtidos em estudos,

entre outras. O processo de validação ocorrerá em observância ao Guia 34 da OECD (BRASIL, 2012a; OECD, 2005).

Os métodos alternativos válidos são aqueles que não passaram por um processo de validação formal, mas existe uma quantidade suficiente de dados científicos para mostrar sua relevância e confiabilidade (PAUWELS; ROGIERS, 2004). Isto significa dizer que são métodos ainda em estudo, passíveis de serem usados, ou seja, com grande possibilidade de virem a ser validados, como por exemplo, o *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM) (PRESGRAVE et al, 2010a).

1.5.1 Métodos alternativos para irritação ocular

Nas últimas décadas, vários grupos de pesquisadores vêm estudando e desenvolvendo métodos alternativos para avaliação de irritação ocular, como alternativas ao teste de Draize.

Atualmente, cinco métodos de teste são aceitos pela OECD para classificar produtos químicos quanto ao potencial de irritação e corrosão ocular, são eles:

Ensaio organotípicos:

- Teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (*Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay* - BCOP), OECD TG 437 - que avalia quantitativamente o potencial irritante de um produto ou substância após aplicação sobre a córnea isolada de bovino, através da medida da opacidade e da permeabilidade após o contato com o produto teste (OECD, 2017c).

- Método de teste de olho de galinha isolado (*Isolated Chicken Eye* - ICE), OECD TG 438 - é um método de teste *in vitro* utilizado para identificar produtos químicos que induzem lesões oculares graves ou que não exigem classificação para irritação ocular ou danos oculares. O produto ou substância são aplicados na córnea, onde os efeitos tóxicos são medidos por uma avaliação qualitativa da opacidade e danos ao epitélio com base na retenção da fluoresceína e uma medição quantitativa do aumento da espessura (OECD, 2018a).

Ensaio baseados em células:

- Teste de Extravazamento de Fluoresceína (Fluorescein Leakage - FL), OECD TG 460 - é um método *in vitro* que pode ser usado para identificar produtos ou substâncias corrosivos oculares solúveis em água e irritantes graves. O ensaio é baseado em citotoxicidade e função celular, realizado em uma monocamada confluyente de células epiteliais tubulares MDCK CB997 que são cultivadas em

inserções semi-permeáveis e modelam o estado não proliferativo do epitélio da córnea *in vivo*. (OECD, 2017b).

- Teste *in vitro* de Curta Duração para Danos Oculares, OECD TG 491, é um método de teste *in vitro* para identificação de produtos ou substâncias que induzem lesões oculares graves ou não requerem classificação para irritação ocular. É um ensaio baseado em citotoxicidade, realizado em uma monocamada confluyente de células *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (SIRC) e a citotoxicidade é medida quantitativamente como a viabilidade relativa das células SIRC usando o ensaio da atividade metabólica mitocondrial (MTT) (OECD, 2018b).

- Método de teste de Epitélio Córnea Humano Reconstruído (RhCE), OECD TG 492, descreve um método *in vitro* que permite a identificação de produtos ou substâncias que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou danos oculares graves. O epitélio reconstruído da córnea humana imita as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do epitélio da córnea humana. O teste avalia a capacidade de um produto químico em induzir citotoxicidade em uma construção de tecido RhCE, medido pelo ensaio MTT (OECD, 2019).

Todos os testes acima visam alterações na córnea, o único teste que visa às alterações na conjuntiva é o HET-CAM, que tem como objetivo avaliar semiquantitativamente o potencial irritante de um produto ou substância sobre a membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (BRASIL, 2012b).

Esses métodos agrupam informações que oferecem subsídios para garantir a segurança do produto a nível ocular.

Como há mais de um mecanismo de irritação ocular, apenas um ensaio não é suficiente para uma completa avaliação. O ideal é obtermos dados relacionados à vascularização (HET-CAM), à opacidade/permeabilidade (BCOP) e à citotoxicidade (MTT) (BRASIL, 2012b).

Para obter a substituição completa do teste de Draize, os métodos de teste *in vitro*, isoladamente ou em combinação, precisam abordar os principais efeitos do tecido ocular que determinam a classificação. Um entendimento profundo do que impulsiona a classificação de produtos químicos no teste de Draize é um elemento crítico e essencial a ser considerado no desenvolvimento de métodos alternativos, na avaliação de sua capacidade e limitações preditivas e na identificação da aplicabilidade de um ensaio específico (BARROSO et al, 2017).

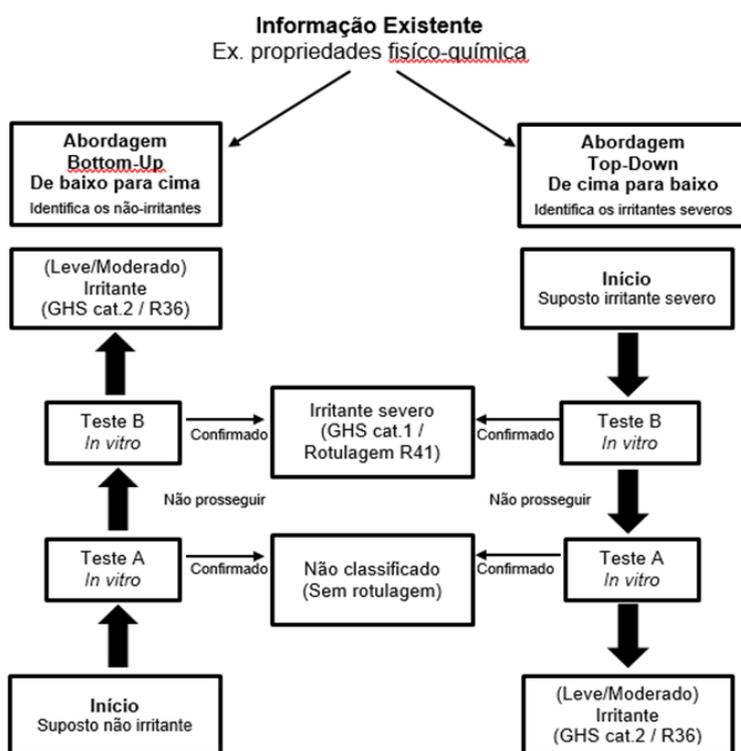
O BCOP e o ICE, por exemplo, foram desenvolvidos para detectar efeitos imediatos da córnea, equivalentes aos três primeiros dias de observação no teste

ocular de Draize. No entanto, ambos os métodos de teste, usando os protocolos atuais, não têm a capacidade de identificar consistentemente efeitos retardados ou efeitos leves/moderados (BARROSO et al, 2017).

O uso de uma bateria *Top-Down* ou *Bottom-Up* (**Figura 7**) seria importante para que definitivamente se substitua o animal, visto que a irritação ocular envolve mais de um mecanismo de toxicidade, portanto um ensaio para um ou dois desfechos ou *endpoints* não é suficiente para uma completa predição da segurança ocular do produto (SCOTT et al, 2010).

A estratégia *Top-down* pode ser lida como algo que signifique “de cima para baixo”, ou seja, a bateria de testes começaria com métodos que podem identificar com mais precisão os produtos ou substâncias irritantes graves. A estratégia *Bottom-up* pode ser entendida como algo próximo a “de baixo para cima”, onde começam-se os testes com o uso de métodos que possam identificar com mais precisão os produtos ou substâncias não irritantes (SCOTT et al, 2010).

Figura 7 – Estratégia *Bottom-Up* (de baixo para cima) e *Top-Down* (de cima para baixo).



Nota. Abordagem da estratégia de teste *Bottom-Up* (de baixo para cima) e *Top-Down* (de cima para baixo) para avaliação da irritação ocular. Esta figura ilustra a estratégia de teste proposta para desenvolver uma estratégia de teste de irritação ocular. Se se espera que o material de teste seja irritante para os olhos, a concentração de baixo para cima é iniciada. Por outro lado, a abordagem de cima para baixo é iniciada se se espera que o material de teste seja um irritante ocular moderado a grave.

Fonte: Adaptado de Scott et al, 2010 Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233309001246?via%3Dihub#bib12>

1.6 Histórico das normas nacionais e internacionais acerca da experimentação animal e uso de métodos alternativos

A lei mais antiga acerca do uso de animais na pesquisa surgiu na Inglaterra, em 1822, e proibia a crueldade contra animais domésticos de grande porte – chamada *British Anticruelty Act* (Ato Britânico Anticrueldade). A primeira legislação específica referente à experimentação animal foi o *British Cruelty to Animal Act* (Ato Britânico contra crueldade em animais) em 1976. Atualizada em 1986, passou a chamar-se *Animals Act 1986*, que gerou um guia operacional – *Guidance on the Operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986* e um código de procedimentos técnicos – *Code Practice for the Housing and Care Animals Used in Scientific Procedures* (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002).

Nos EUA, a primeira lei relacionada à utilização de animais em pesquisas foi o *Laboratory Animal Welfare Act* assinada em 1966, que após sofrer diversas modificações passou a denominar-se *Animal Welfare Act* (Lei de Bem-estar Animal), que regula o uso de animais em pesquisa, exigindo padrões mínimos de cuidado e tratamento. Várias emendas foram incorporadas à Lei no decorrer dos anos, sendo a mais importante o reconhecimento da obrigatoriedade de existência das comissões institucionais de ética no uso de animais (*Institutional Animal Care and Use Committee* – IACUC) (PAIXÃO; SCHRAMM, 2008).

A União Europeia, adotou progressivamente medidas no sentido de banir o uso de animais em testes, como através da Diretiva 76/768/EEC (*European Economic Community*) de 1976, conhecida como “Diretiva de Cosméticos”, que estabeleceu as regras gerais para o setor, como quais substâncias estariam permitidas ou proibidas na fabricação de cosméticos, bem como questões de rotulagem, segurança e comercialização (EEC, 1976). Essa Diretiva sofreu diversas emendas, tanto por pressão dos setores dos fabricantes de produtos cosméticos, bem como dos consumidores e ativistas defensores dos Direitos Animais.

Em 1986, a Directiva 86/609/EEC, regulamentou a utilização de animais para fins experimentais e outros fins científicos. Melhora o controle da utilização de animais de laboratório e estabelece padrões mínimos para cuidados e enriquecimento ambiental, estabelece a formação do pessoal que manuseia estes animais e a supervisão dos experimentos. Também visa reduzir o número de animais utilizados, incentivar o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos para substituir os testes em animais (EEC, 1986). Em 2010 essa Diretiva é revogada pela Diretiva 2010/63/EU cujo objetivo permaneceu o mesmo, porém referindo-se diretamente aos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*), e os Estados-Membros passaram a auxiliar a Comissão Europeia na identificação e nomeação de laboratórios especializados e qualificados para a realização de estudos de validação dos métodos alternativos (EU, 2010).

Uma das principais modificações sofridas pela Diretiva 76/768/EEC foi introduzida pela Diretiva 2003/15/EC, adotada como a sétima emenda da Diretiva de Cosméticos, que proibiu a colocação no mercado de produtos cosméticos cuja formulação final, ingredientes ou combinações de ingredientes, que tenham sido objeto de ensaios em animais mediante a utilização de um método que não seja um método alternativo validado e aprovado a nível científico, levando em consideração, o desenvolvimento e validação de métodos alternativos no âmbito da OECD (EC, 2003).

Em 2013 a Diretiva 76/768/EEC foi substituída pelo Regulamento EC nº 1223/2009, que reforçou os requisitos de segurança dos produtos cosméticos vendidos na UE tornando-os mais seguros, simplifica os procedimentos para empresas e autoridades reguladoras do setor; atualiza as regras para levar em conta os mais recentes desenvolvimentos tecnológicos, incluindo o possível uso de nanomateriais e interpreta o termo “alternativas” como sendo o conceito dos 3Rs (EC, 2009).

O documento internacional mais importante para proteção dos animais é a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), adotada em janeiro de 1978. Neste documento está descrito o direito dos animais à liberdade, o direito de não sofrerem maus-tratos e a vedação à utilização de experimentos que impliquem dor física, bem como orienta para a utilização de procedimentos em que os animais sejam substituídos por outros métodos de teste. Surgia, pela primeira vez, a ideia de algo próximo a uma dignidade animal (UNESCO, 1978).

No Brasil a primeira legislação a regular e proteger os animais foi o Decreto nº 16.590, de 10 de setembro de 1924 que ao regulamentar as atividades das Casas de Diversões Públicas, proibiu as corridas de touros, garraios e novilhos, brigas de galos e canários, dentre outras diversões que causassem sofrimento aos animais. Em seguida veio o Decreto-Lei nº 24.645, de 10 de julho de 1934, que previu sanção para aqueles que praticassem maus-tratos aos animais e elencou quais desses atos podem ser relacionados à prática de utilização de animais em pesquisas (MASCHIO, 2005).

Em seguida, a crueldade contra animais, independente de fins didáticos ou científicos, foi tipificada como contravenção penal pelo artigo 64 do Decreto-Lei nº 3.688, de 3 de outubro de 1941, a Lei das Contravenções Penais (MASCHIO, 2005).

O primeiro Projeto de Lei a tramitar na Câmara dos Deputados tratando exclusivamente da prática da experimentação animal foi o PL nº 1.507/1973, que gerou a subsequente edição da Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e estabeleceu as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (BRASIL, 1979).

A Constituição Federal de 1988 em seu capítulo referente ao meio ambiente, proíbe a prática de crueldade contra os animais (BRASIL, 1988).

A Lei de Crimes Ambientais, Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 prevê, no artigo 32, parágrafos 1º e 2º, detenção de três meses a um ano e pagamento de multa a quem realizar experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que com

fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos. Esta lei adota parcialmente as noções contidas nos 3R's (BRASIL, 1998a).

O Projeto de Lei de nº 1.153/1995, após treze anos de trâmite legislativo, resultou na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 que regulamenta o artigo 225 da Constituição Federal e revoga a Lei nº 6.638/1979, ficando conhecida popularmente como Lei Arouca, foi o primeiro diploma legal que estabeleceu procedimentos para o uso científico de animais, também criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) (BRASIL, 2008). Essa Lei foi regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e este define os métodos alternativos (BRASIL, 2008).

O CONCEA é um órgão integrante da estrutura do Ministério da Ciência Tecnologia Inovação e Comunicações (MCTIC), e, considerado como uma instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal, para coordenar os procedimentos de uso científico de animais. Entre suas atribuições estão zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária e ética de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica; cadastrar o maior número possível de instituições que criam ou utilizam animais com finalidade de ensino e pesquisa científica através do Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA); além de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos que substituam a utilização de animais em ensino ou pesquisa científica; entre outras (BRASIL, 2009).

Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional, que crie ou utilize animais para ensino ou pesquisa científica, deverá constituir ou estar vinculada a uma CEUA para requerer credenciamento no CONCEA. A CEUA é o componente essencial para aprovação, controle e vigilância das atividades de criação, ensino e pesquisa científica com animais, bem como para garantir o cumprimento das normas de controle da experimentação animal editadas pelo CONCEA. As CEUAs devem ser compostas por médicos veterinários, biólogos, docentes e pesquisadores na área específica, e por um representante de sociedade protetora de animais legalmente estabelecida no País. A ética no uso de animais será garantida pela avaliação da relevância científica do procedimento que justifique o uso dos animais, da preocupação com a minimização da dor e sofrimento animal através da utilização de métodos de analgesia, anestesia e eutanásia adequados, da realização de desenhos estatísticos prévios, do cuidado com as condições básicas de

manutenção da vida animal e do incentivo à substituição do animal não humano por métodos alternativos sempre que possível (BRASIL, 2009).

Em 4 de julho de 2014 foi publicado no Diário Oficial da União a Resolução Normativa nº 17 do CONCEA, que dispõe sobre o reconhecimento no Brasil de métodos alternativos validados por entidades como o BraCVAM ou por estudos colaborativos internacionais publicados em compêndios oficiais (BRASIL, 2014a). O CONCEA pela Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014, reconheceu 17 métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa, conforme exemplificado no **Quadro 1**, com a finalidade de redução, substituição ou refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. Nesta resolução ficou estabelecido o prazo de cinco anos para a substituição obrigatória do método original pelo alternativo (BRASIL, 2014b).

A Anvisa, por intermédio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 35, de 11 de agosto de 2015 aceita o uso dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos no Brasil pelo CONCEA, nos termos da Resolução Normativa nº 17/2014, com o objetivo de substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa (BRASIL, 2015b).

Em 19 de agosto de 2016 foi publicada a Resolução Normativa do CONCEA nº 31, reconhecendo o uso no país de mais sete métodos alternativos validados, também descritos no **Quadro 1**. A resolução estabeleceu o prazo de cinco anos para a substituição obrigatória do método original pelo alternativo (BRASIL, 2016a).

Recentemente, em 22 de outubro de 2019, foi publicada a Resolução Normativa do CONCEA nº 45, reconhecendo mais um método alternativo, o Teste de Ativação de Monócitos (MAT), estipulando também um prazo de cinco anos para a substituição obrigatória do método original pelo alternativo, também descrito no **Quadro 1** (BRASIL, 2019).

Quadro 1 - Métodos alternativos reconhecidos nas resoluções normativas do CONCEA (continua)

Resolução Normativa nº 18/2014 do CONCEA	
Em vigor desde: setembro/2019	
Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele	OECD 430 – Corrosão Dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea
	OECD 431 – Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída
	OECD 435 – Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i>
	OECD 439 – Teste de Irritação Cutânea <i>in vitro</i>
Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	OECD 437 – Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina
	OECD 438 – Teste de Olho Isolado de Galinha
	OECD 460 – Teste de Extravazamento de Fluoresceína
Avaliação do potencial de fototoxicidade	OECD 432 – Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU
Avaliação da absorção cutânea	OECD 428 – Absorção Cutânea Método <i>in vitro</i>
Avaliação do potencial de sensibilização cutânea	OECD 429 – Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local
	OECD 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local
Avaliação de toxicidade aguda	OECD 420 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas
	OECD 423 – Toxicidade Aguda Oral – Classe Tóxica Aguda
	OECD 425 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento <i>Up and Down</i>
Avaliação de toxicidade aguda	OECD 129 – Estimativa da Dose Inicial para Teste de Toxicidade Aguda Oral Sistêmica
Avaliação de genotoxicidade	OECD 487 – Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>

Quadro 1 - Métodos alternativos reconhecidos nas resoluções normativas do CONCEA (conclusão)

Resolução Normativa nº 31/2016 do CONCEA	
Data limite para implantação: setembro/2021	
Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	OECD 491 - Teste <i>in vitro</i> de Curta Duração para Danos Oculares
	OECD 492 - Epitélio Corneal Humano Reconstruído
Avaliação do potencial de sensibilização cutânea	OECD 442C - Sensibilização Cutânea <i>in chemico</i>
	OECD 442D - Sensibilização Cutânea <i>in vitro</i>
Avaliação de toxicidade reprodutiva	OECD 421 - Teste de Triagem para Toxicidade Reprodutiva e do Desenvolvimento
	OECD 422 - Estudo de Toxicidade Repetida Combinado com Teste de Toxicidade Reprodutiva
Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis	Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)
Resolução Normativa nº 45/2019 do CONCEA	
Data limite para implantação: outubro/2024	
Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis	Teste de Ativação de Monócitos (Farmacopeia Europeia)

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Fonte: (Registro feito pela autora).

Os métodos alternativos descritos nas Resoluções Normativas encontram-se formalmente validados por centros internacionais de validação, seguindo o Guia 34 da OECD, e possuem aceitação regulatória internacional (OECD, 2005).

A Comissão de Ciência e Tecnologia (CCT) aprovou no dia 22 de março de 2017 o Projeto de Lei da Câmara nº 70 de 2014 (PLC 70/2014) que proíbe testes de ingredientes e de produtos cosméticos, veda o comércio de produtos que tenham sido testados em animais e incentiva técnicas alternativas internacionalmente reconhecidas para avaliar a segurança das formulações (BRASIL, 2014c).

O Projeto de Lei da Câmara - PLC nº 70/2014 sofreu várias modificações em seu texto original sendo criticado por vários cientistas como sendo um grande retrocesso em relação a um projeto amplamente discutido em diferentes audiências públicas, onde todos os setores opinaram e que havia sido construído na Câmara. As

alterações poderão trazer atraso à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico do País. A proposta prevê alterar pontos da Lei Arouca que já estão devidamente contempladas em ações do CONCEA, constituindo, portanto, “um retrocesso legal”. As ações do CONCEA são mais abrangentes no que se refere à substituição da utilização de animais por métodos alternativos e proíbem a utilização de animais para técnicas metodológicas em qualquer produto e não somente para cosméticos, como propõe o PLC nº 70/2014 (BRASIL, 2014c).

1.7 HET-CAM

Os modelos de embriões de galinha são utilizados há muito tempo por toxicologistas e virologistas, sendo utilizados pela medicina experimental, embriologia, microbiologia, transplante de tecidos e vários aspectos da biologia tumoral. A membrana corioalantóide (CAM) do ovo embrionado é um tecido completo incluindo artérias, capilares e veias sendo tecnicamente fácil de estudar. Responde a lesões com uma reação inflamatória completa, um processo semelhante ao induzido no tecido conjuntival do olho de coelho e não tem sensação de dor. Os ovos férteis são baratos e não exigem instalações elaboradas (LEIGHTON et al, 1983). O teste da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) foi proposto por Luepke como um método alternativo (LUEPKE, 1985). Mais tarde, nos anos 90, Spielmann contribuiu para ampliar a aplicação desse método, adaptando-o para poder classificar irritantes oculares (SPIELMANN et al., 1991; SPIELMANN, 1993; 1996; 1997). O procedimento foi publicado através do protocolo número 47 da INVITTOX (INVITTOX, 1992). Já em 1996 foi publicado no Jornal Oficial da República Francesa, o protocolo francês seguindo o método proposto por Luepke com pequenas alterações (FRANÇA, 1996). Os dois protocolos são utilizados nos seus países de origem e possuem diferenças importantes de execução e análises de resultados.

O HET-CAM é um método alternativo válido, utilizado para avaliação do potencial de irritação ocular de produtos químicos. O olho é uma estrutura complexa e sujeito a vários tipos de efeitos adversos, portanto, o HET-CAM é um método importante, pois é o único método organotípico, que aborda diretamente os efeitos conjuntivais, ou seja, é o único que mimetiza a conjuntiva do olho, fornecendo dados relacionados a eventos vasculares, incluindo hiperemia, hemorragia e coagulação (ICCVAM, 2006). O método tem por objetivo avaliar semiquantitativamente o potencial irritante de um produto químico sobre a CAM de ovo embrionado de galinha por meio

da observação dos seus efeitos irritantes sobre a membrana imediatamente após a aplicação do produto químico puro ou diluído (LUEPKE, 1985, LUEPKE; KEMPER, 1986). As vantagens desse teste são sua simplicidade, rapidez, fácil manipulação e relativamente o baixo custo.

O princípio baseia-se na observação, dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e de coagulação) que podem ocorrer dentro de 5 min após a aplicação do produto químico, puro ou diluído, na CAM de ovo embrionado de galinha com dez dias de incubação. A CAM é um tecido completo contendo um sistema vascular (veias e artérias, capilares). Responde a lesão com um processo inflamatório semelhante ao que seria observado no tecido da conjuntiva de olho de coelho albino (LUEPKE; KEMPER, 1986).

No protocolo francês (FRANÇA, 1996), após a aplicação do produto o cronômetro é ativado, depois de 20 seg de contato, a CAM é lavada com mais ou menos 5 mL de solução isotônica de cloreto de sódio (NaCl 0,9%), e os fenômenos são observados visualmente a olho nu, sob luz fria, durante 5 min e anotados assim que aparecem (hiperemia, hemorragia e coagulação). De acordo com a pontuação obtida o produto é classificado (não irritante, irritante leve, irritante moderado e irritante severo).

Já pelo protocolo alemão (INVITTOX, 1992), após a aplicação do produto os fenômenos são gravados com o auxílio de um *software* ligado a uma lupa estereoscópica por 5 min, posteriormente a gravação é observada e os fenômenos são anotados assim que aparecem (hemorragia, lise vascular e coagulação). De acordo com a pontuação obtida o produto é classificado (não reação, ligeira reação, reação moderada e reação severa).

1.8 Justificativa

O INCQS realiza análises em diversos produtos (alimentos, medicamentos, soros e vacinas, cosméticos, saneantes, etc.) sujeitos à legislação sanitária vigente, tanto para atestar a conformidade dos mesmos frente ao descrito no processo de registro, quanto para apurar possíveis adulterações que tenham originado denúncias de agravos à saúde. Como órgão de referência nacional para questões relativas ao controle da qualidade de produtos, é dever do INCQS manter as metodologias analíticas utilizadas em consonância com os avanços técnico-científicos, buscando a transferência de tecnologia e o desenvolvimento, a validação e a implantação de

métodos de maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. As ações nesta área de atuação garantem não só a qualidade dos produtos ofertados à população, mas também o adequado cumprimento do seu papel de liderança.

Existe uma legislação internacional fortemente consolidada no que diz respeito ao uso de métodos alternativos, e que vem sendo seguida pelo Brasil, principalmente a partir de 2008 pela Lei nº 11.794/2008 e em 2014 por meio das Resoluções Normativas do CONCEA nºs 17, 18, e em 2016 pela Resolução Normativa do CONCEA nº 31 (BRASIL, 2014a; 2014b; 2016a).

Assim, este projeto se justifica pela necessidade em seguir a legislação brasileira em relação ao uso do teste de Draize, já que a partir de 2019 estes testes deverão ser utilizados no lugar do teste *in vivo*. Apesar de existir uma bateria de métodos alternativos validados, o uso do teste HET-CAM é importante para se avaliar produtos não irritantes e sendo importante para a implantação da estratégia *Bottom-Up*. Além disso, o teste HET-CAM possui várias vantagens, incluindo simplicidade, rapidez, sensibilidade, facilidade de desempenho e seu baixo custo relativo.

Todos os métodos validados são voltados para a avaliação da córnea e, portanto, o HET-CAM é o único método organotípico, que aborda diretamente os efeitos conjuntivais, mimetizando o que acontece no teste de Draize.

Ainda não há estudos que demonstrem se há diferença na classificação dos produtos dependendo do uso do protocolo. Esta avaliação será primordial para uma melhor compreensão dos protocolos existentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar os diferentes protocolos do HET-CAM, Protocolo Francês e Protocolo Alemão, por meio da avaliação do potencial irritante ocular de substâncias químicas.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento no banco de dados do Setor de Irritação do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do INCQS de produtos e substâncias químicas analisados no teste de Draize;
- Comparar os resultados obtidos por meio da realização dos dois protocolos do teste HET-CAM com os resultados do teste de Draize do banco de dados;
- Analisar se as diferenças metodológicas interferiram no resultado final das análises;
- Propor uma otimização do protocolo;
- Elaborar o Procedimento Operacional Padronizado (POP) do método.

3 METODOLOGIA

3.1 Levantamento dos produtos e substâncias químicas analisados no Setor de Irritação

Foram levantados os resultados das análises realizadas em tensoativos e produtos cosméticos pertencentes ao banco de dados do Setor de Irritação, Laboratório de Toxicologia do DFT, INCQS, realizadas pelo teste de Draize segundo POP INCQS nº 65.3330.004 (**ANEXO A**). Ao realizar esta busca observamos que todos os produtos cosméticos tiveram alguma substância de sua composição alterada. Sendo assim, foram utilizados somente os tensoativos no presente estudo.

3.2 Tensoativos

Foram escolhidos para este estudo nove tensoativos com diferentes concentrações, totalizando vinte e duas amostras para serem analisadas em paralelo pelos protocolos alemão e francês do teste HET-CAM, são elas: lauril sulfato de sódio 15%, 8%, 4%, 2% e 0,25%; cloreto de benzalcônio 1%, 0,5% e 0,25%; Triton X-100 30%, 1% e 0,5%; Tween-20 30% e 1%; álcool cetoestearílico a 10%; SPAN 80 0,5% e 0,25%; lauril éter sulfato de sódio 30%, 10% e 5%; lauril poliglucosídeo 10% e brometo cetil dimetil amonio 0,5% e 0,25%. Essas amostras foram classificadas pelo teste de Draize como irritante severo (quatro), irritante moderado (três), irritante leve (quatro) e como não irritantes (onze). No **Quadro 2**, consta a relação dos tensoativos, fabricante e número de registro de cada substância no Chemical Abstracts Services (CAS).

Quadro 2 – Teste HET-CAM¹: Relação dos tensoativos empregados, fabricante e Registro CAS (*Chemical Abstracts Service*) (continua).

Tensoativos	Fabricante	Registro CAS
Lauril sulfato de sódio ou dodecilsulfato de sódio (SDS)	Sigma - Aldrich	151-21-3
Cloreto de benzalcônio	Sigma - Aldrich	63449-41-2
Triton X-100	Sigma - Aldrich	9002-93-1

Quadro 2 - Teste HET-CAM¹: Relação dos tensoativos, fabricante e CAS (*Chemical Abstracts Service*) (conclusão).

Tween-20	Sigma - Aldrich	9005-64-5
Álcool cetosteárico	Sigma - Aldrich	68439-49-6
SPAN 80	Sigma - Aldrich	1338-43-8
Lauril éter sulfato de sódio - SLES	Sigma - Aldrich	9004-82-4
Lauril poliglucosídeo	Sigma - Aldrich	110615-47-9
Brometo cetil dimetil amonio	Sigma - Aldrich	124-03-8

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Os tensoativos Triton X-100 e álcool cetosteárico utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pela empresa L’Oreal, localizada no Rio de Janeiro, RJ e o lauril poliglucosídeo foi gentilmente doado pela empresa Natura, localizada em Cajamar, SP.

3.3 Teste de Draize

Os dados relacionados ao teste de Draize foram provenientes do banco de dados do DFT do INCQS, sendo esse teste considerado o padrão ouro. Os ensaios *in vivo* foram realizados segundo o POP n° 65.333.004 do INCQS/FIOCRUZ (**ANEXO A**).

Nenhum animal foi utilizado neste estudo. Os testes de rotina foram licenciados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/FIOCRUZ (L-010/05, LW-44/14 e LW-09/19).

3.4 HET-CAM

Para a realização deste estudo, foi realizado o teste HET-CAM pelo protocolo francês (FRANÇA, 1996) e protocolo alemão (INVITTOX, 1992).

3.4.1 Ovos

Os ovos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Produção de Vacina contra Febre Amarela – Bio-Manguinhos – Fundação Oswaldo Cruz e são provenientes das empresas Charles River e/ou VALO BioMedia. Foram utilizados

ovos livres de patógenos específicos (SPF), fertilizados, de galinha da raça *White Leghorn*, pesando entre 50 e 75 g, com 10 dias de incubação.

Os ovos foram identificados e incubados, na posição vertical (câmara de ar para cima), em incubadoras com um sistema automático de rotação (Premium Ecológica - IP70), sob condições controladas de temperatura de $37,8 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de aproximadamente 50% a 60%. No nono dia de incubação a rotação foi suspensa, permanecendo os ovos na posição vertical, com a câmara de ar para cima (**Figura 8**).

Figura 8 - Incubadora de ovos com sistema automático de rotação¹ empregados no teste HET-CAM²



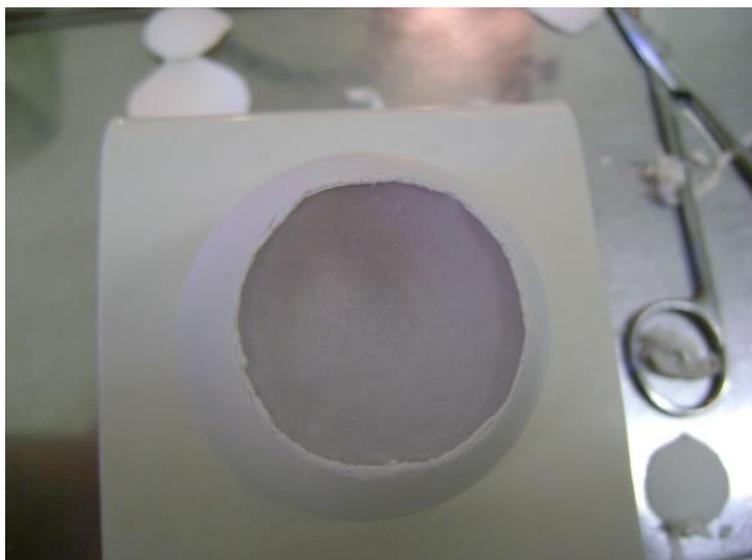
¹Premium Ecológica IP 70. ²Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

Fonte: (Registro feito pela autora).

No décimo dia de incubação, os ovos foram retirados da incubadora e passaram por um processo de ovoscopia, ou seja, foram colocados sob luminária com lâmpada de luz fria, a fim de identificar e eliminar os ovos defeituosos (imagem que não corresponde à fase esperada do desenvolvimento do embrião). Os ovos selecionados foram colocados verticalmente em um suporte (câmara de ar para cima).

A casca de cada ovo foi perfurada na região da câmara de ar, desbastada, com a tesoura sem ponta, até o limite da membrana da casca, tomando cuidado para não danificar a CAM (**Figura 9**).

Figura 9 - Teste HET-CAM¹: Ovo embrionado com a membrana da casca exposta



1Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

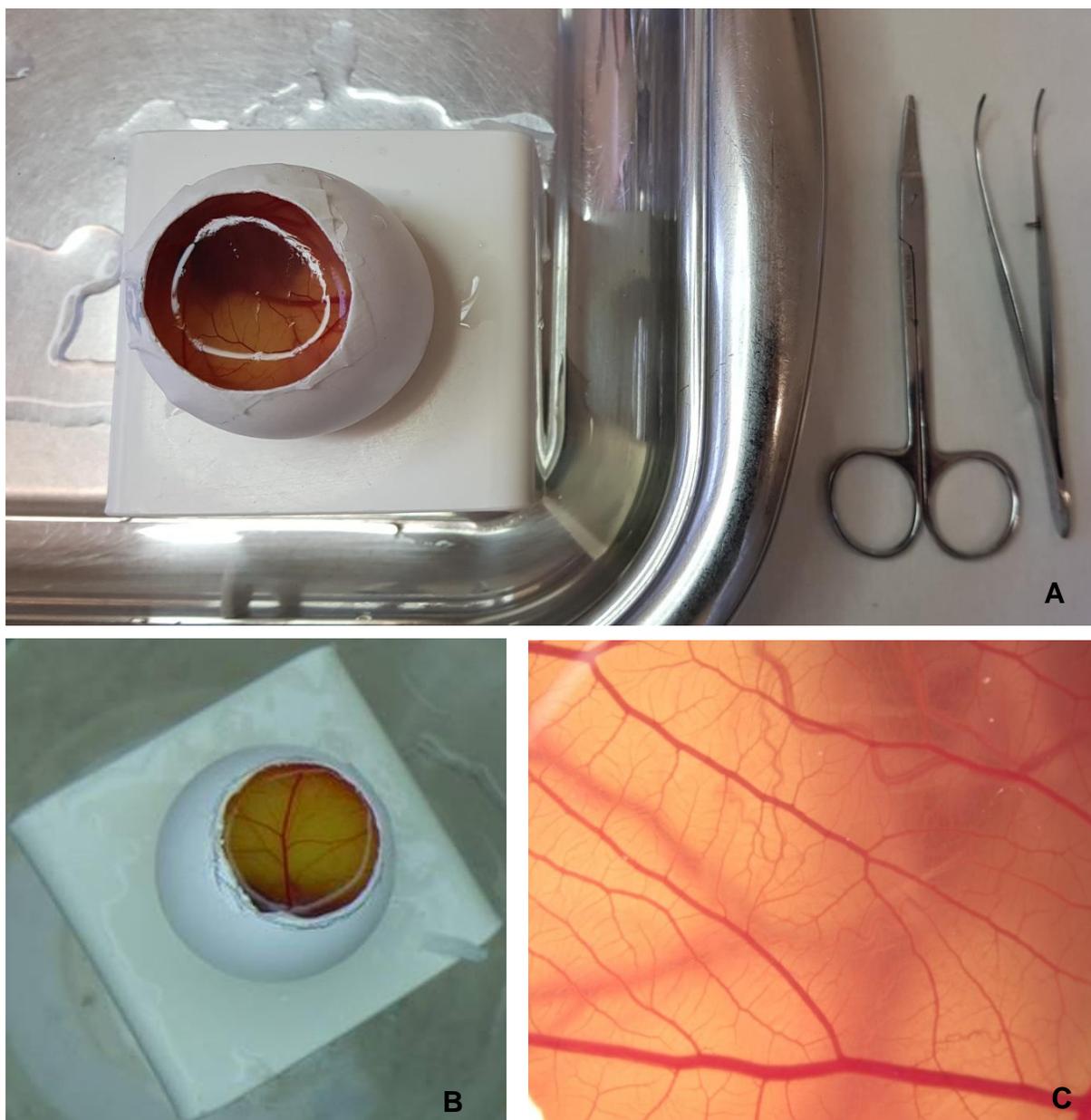
Fonte: (Registro feito pela autora).

Toda a superfície da membrana da casca foi umedecida com aproximadamente 2 mL de solução de NaCl a 0,9%, aquecida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (banho-maria). O excesso de solução foi eliminado pela inclinação do ovo, a membrana da casca foi removida delicadamente com uma pinça de iris curva, expondo a CAM (**Figura 10**). Qualquer ovo, cuja CAM estivesse danificada (presença de hemorragia e de qualquer outra lesão), foi imediatamente rejeitado.

Após o término dos experimentos (HET-CAM – Protocolo Francês e HET-CAM – Protocolo Alemão) os embriões foram submetidos à eutanásia através do congelamento dos ovos inteiros, postos diretamente em freezer a -20°C , para posterior autoclavação e descarte de acordo com o gerenciamento de resíduos do INCQS.

O ensaio HET-CAM está licenciado pela CEUA da Fiocruz, sob n° LW-08/19.

Figura 10 – Teste HET-CAM¹: Ovo embrionado e materiais utilizados



¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

A - Ovo embrionado com a membrana corioalantóide exposta e materiais utilizados, B - Ovo embrionado com a membrana corioalantóide exposta e C - membrana corioalantóide normal.
Fonte: (Registro feito pela autora).

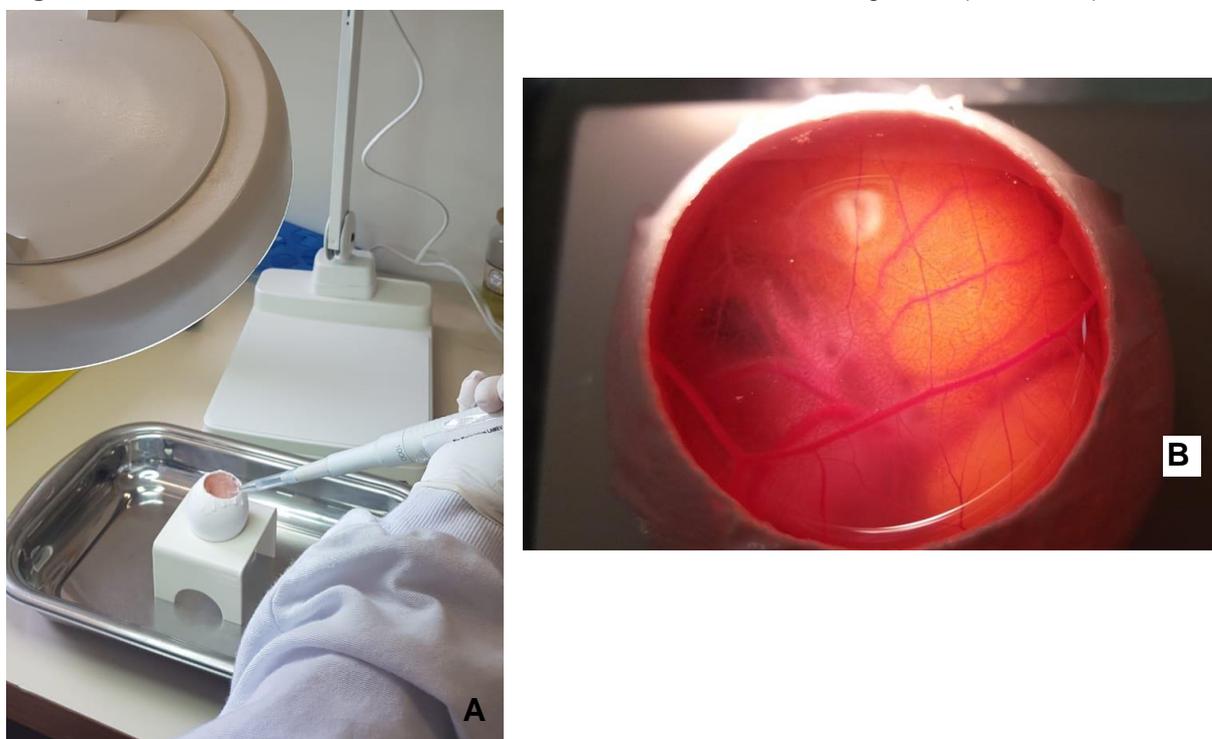
3.4.2 HET-CAM – Protocolo Francês

Para a realização do protocolo francês foram utilizados quatro ovos para cada amostra da solução teste (controle positivo, controle negativo e tensoativos) e cada experimento foi repetido três vezes.

Foram adicionadas 300 μL da solução teste cuidadosamente sobre a CAM com micropipeta (**Figura 11**). A solução teste foi aquecida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes do uso.

Imediatamente após a aplicação, o cronômetro foi ativado. Depois de 20 seg de contato, a CAM foi lavada com pelo menos 5 mL de solução de NaCl 0,9% (mantida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho-maria) com uma seringa, evitando qualquer projeção abrupta. Caso a substância não tenha sido retirada totalmente, novas lavagens foram realizadas. O líquido de lavagem foi eliminado pela inclinação do ovo. A membrana foi observada durante 5 min incluindo os 20 seg do tempo de contato. A observação dos fenômenos para anotação foi realizada a olho nu, sob uma intensidade luminosa constante, utilizando uma fonte luminosa que não gerasse calor excessivo (**Figura 11**).

Figura 11 – Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM).



A – Aplicação do tensoativo na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha e B - Ovo embrionado com a membrana corioalantóide exposta ao tensoativo.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Os fenômenos observados (hiperemia, hemorragia, coagulação/opacidade) foram registrados de acordo com o tempo de ocorrência. O tempo foi anotado logo que ocorreu o aparecimento de cada fenômeno. As reações fisiológicas observadas foram graduadas em função de seu tempo de aparecimento, conforme indicado no **Quadro 3**.

Quadro 3 - Graduação das alterações observadas na membrana córioalantoide do ovo embrionado de galinha no teste HET-CAM¹.

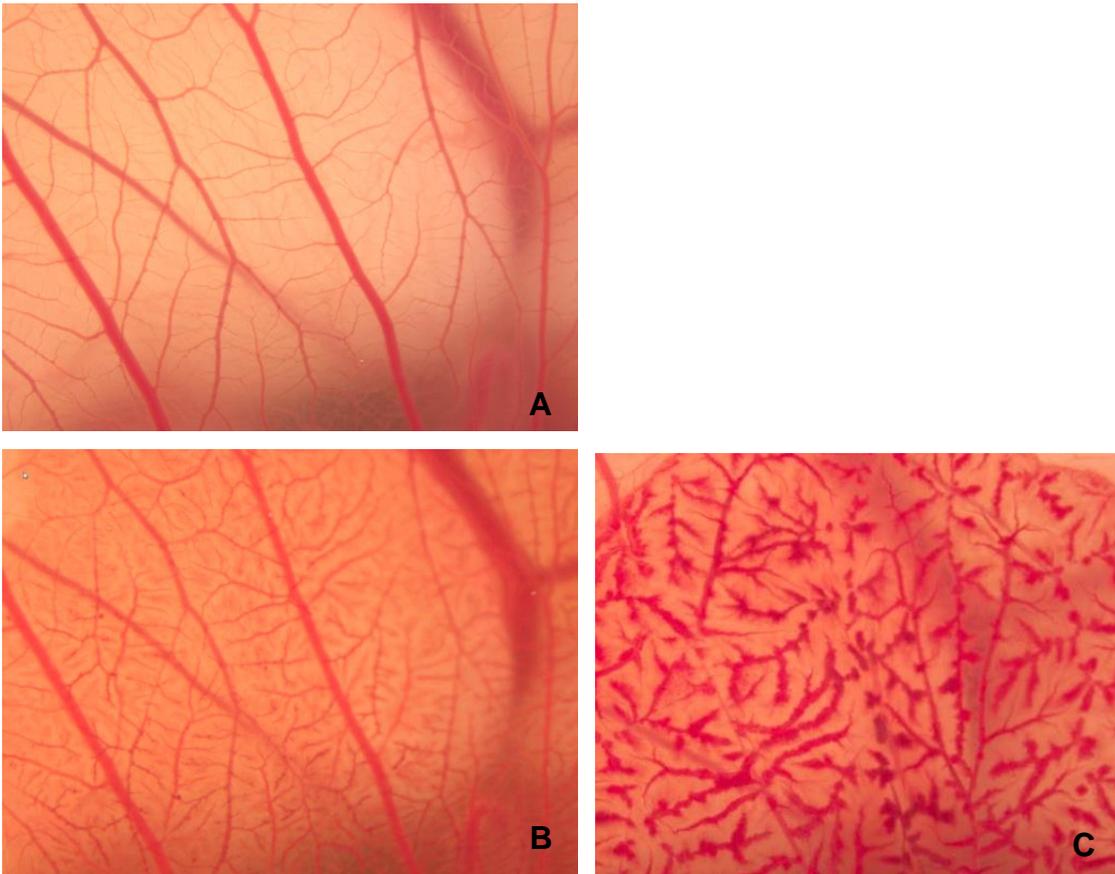
Fenômenos	Tempo (T)		
	T ≤ 30 seg	30 seg < T ≤ 2 min	2 min < T ≤ 5 min
Hiperemia/Congestão	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade/Trombose	9	7	5
T – Tempo; seg – segundos; min - minutos			

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

Fonte: (FRANÇA, 1996).

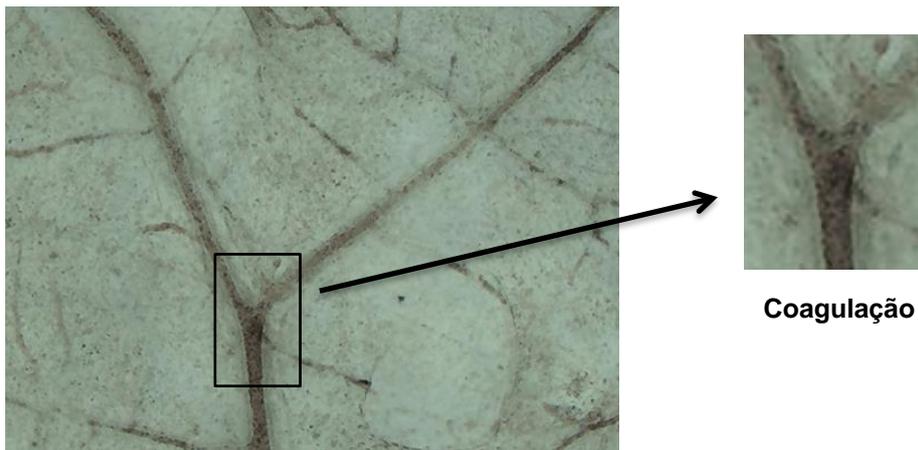
Os fenômenos observados foram: 1) Hiperemia/Congestão - capilares que não eram visíveis antes da adição do produto tornam-se visíveis ao passo que os capilares visíveis dilatam-se e tornam-se mais vermelhos. Esse fenômeno também pode afetar os vasos de maior diâmetro; 2) Hemorragia - liberação de sangue difuso dos vasos e/ou capilares, tendo diferentes aparências, e em particular de "couve-flor", em camada, de véu difuso, de pontilhado (sangue escapa seletivamente a partir de diferentes lugares da membrana). A hemorragia pode ter uma vida curta característica; no entanto, deve ser levada em conta, a observação durante os primeiros 30 seg, de uma hemorragia massiva levando-se em conta a hiperemia prévia; e 3) Coagulação (opacidade e/ou trombose) – sendo a opacidade, aparência, na totalidade ou parte da membrana, ou presença de um véu opalescente possivelmente evoluindo para opacidade ou de uma opacidade diretamente. É necessário verificar se este fenômeno não está relacionado com o comportamento físico-químico do produto em meio aquoso; e a trombose, ruptura do fluxo sanguíneo nos vasos, resultando em uma aparência segmentada (alternância entre constrições e áreas mais ou menos escuras turgentes) (**Figuras 12 e 13**).

Figura 12 - Membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.



Membrana corioalantóide – A- Normal B e C- Hemorragia.
Fonte: (Registro feito pela autora).

Figura 13 - Membrana corioalantóide – Coagulação.



Fonte: (Imagem extraída do vídeo feito pelo Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz).

A classificação final do tensoativo quanto ao potencial de irritação no teste HET-CAM é dada através dos escores descritos no **Quadro 4**.

A pontuação para cada ovo é a soma das graduações de hiperemia, hemorragia e coagulação. A classificação final do tensoativo foi a média aritmética das pontuações obtidas nos quatro ovos. A notação máxima é 21.

Quadro 4 - Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no teste HET-CAM¹

Média da Pontuação Faixa (gradação das lesões)	Classificação
0,0 a 0,9	Não Irritante (NI)
1,0 a 4,9	Irritante Leve (IL)
5,0 a 8,9	Irritante Moderado (IM)
9,0 a 21,0	Irritante Severo (IS)

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

Fonte: (FRANÇA, 1996).

Antes do início de cada série de testes, foram realizados, em quatro ovos do mesmo lote dos ovos utilizados no estudo, o controle negativo e controle positivo que tem por objetivo verificar a qualidade dos ovos. O controle negativo foi realizado com solução de NaCl a 0,9% a $37 \pm 1^\circ\text{C}$; e o controle positivo com uma solução de SDS a 1% a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A classificação se deu através da média aritmética das pontuações obtidas nos quatro ovos e o resultado foi de acordo com o preconizado no protocolo francês, controle negativo entre 0,0 e 3,0 e controle positivo entre 10 e 12, em todos os experimentos e repetições.

3.4.3 HET-CAM – Protocolo Alemão

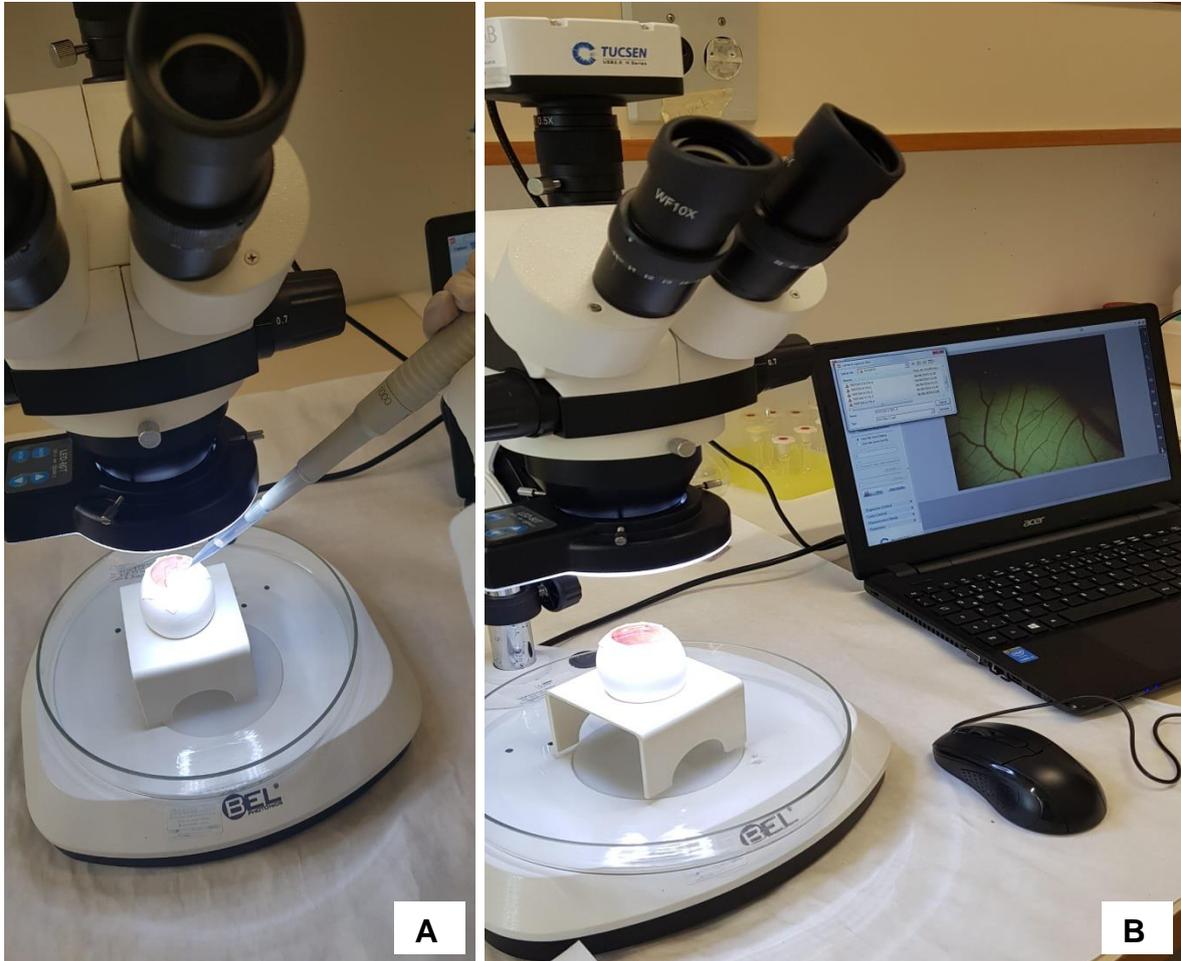
Para a realização do Protocolo Alemão foram utilizados três ovos para cada amostra da solução teste (controle positivo, controle negativo e tensoativos) e cada experimento foi repetido três vezes.

Foram adicionadas 300 μL da solução teste cuidadosamente sobre a CAM com micropipeta (**Figura 14**). A solução teste foi aquecida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes do uso.

Os fenômenos foram gravados com o auxílio do *software* ISCapture Imaging Application 86x - TUCSEN[®] ligado a uma Lupa estereoscópica (BEL[®] Photonics – LED-60T) aumento de 7x (ajustes para maior nitidez da imagem podem ser necessários) e câmera (TUCSEN[®] – USB2.0 HSeries modelo ISH500) (**Figura 14**), por 5 min sem interrupção. Posteriormente, a gravação foi observada e os fenômenos foram registrados em seg de acordo com a velocidade com que o dano ocorre:

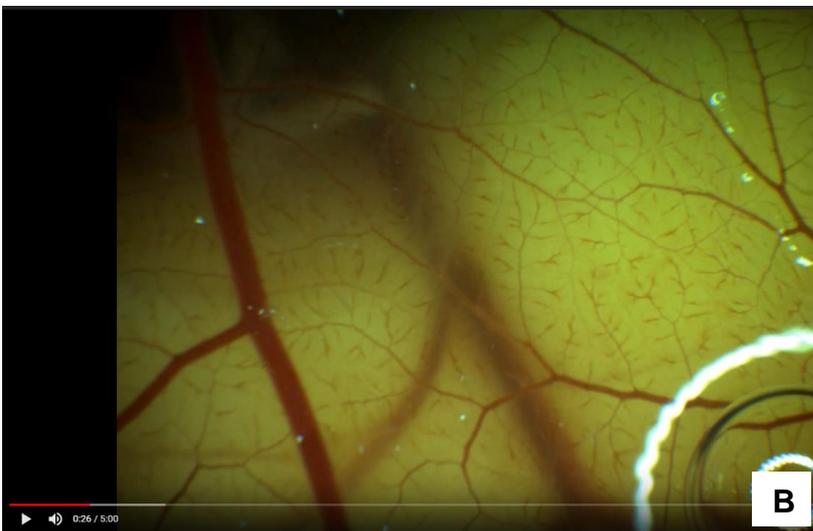
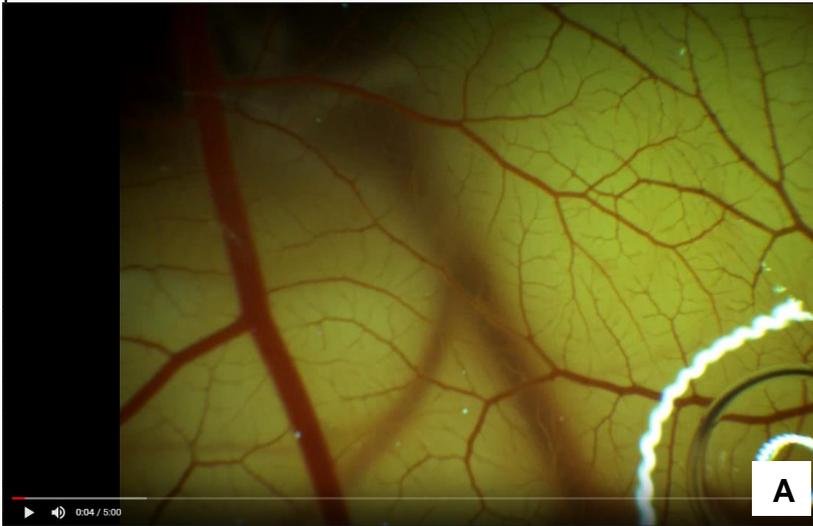
hemorragia, lise vascular (desintegração dos vasos sanguíneos) e coagulação (Figura 15).

Figura 14 - Equipamentos utilizados na realização do teste HET-CAM¹ segundo protocolo n°47 INVITTOX²



¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.²INVITTOX, 1992.
 A: Lupa estereoscópica (BEL® Photonics – LED-60T) acoplada à câmera (TUCSEN® – USB2.0 H Series modelo ISH500). B: Lupa estereoscópica acoplada à câmera acoplado ao PC com *software* ISCapture Imaging Application 86x - TUCSEN® para análise das alterações na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.
 Fonte: (Registro feito pela autora).

Figura 15 – Registro da filmagem da membrana corioalantóide durante o teste HET-CAM¹ segundo protocolo nº 47 INVITOX² com aumento de 7x.



¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.² Disponível em: https://http://ecvam-sis.jrc.it/invittox/published/indexed_47.html.

Membrana corioalantóide: A- Normal; B- Hemorragia; C- Lise vascular.

Imagens obtidas a partir do *software* ISCapture Imaging Application 86x - TUCSEN®

Fonte: (Registro feito pela autora).

A concentração limite do tensoativo (*Threshold Concentration* – TH) é definida como a concentração mais alta do tensoativo que proporciona reações leves. Para determinar essa concentração limite, foram aplicados 300 µL da concentração inicial (recomenda-se iniciar com 5%) em três ovos, se a reação observada for leve, a concentração deve ser duplicada e se for moderada ou grave, a concentração deve ser dividida em dois ou dez, até obter a concentração limite.

Em seguida o escore de irritação (ES) foi determinado para uma solução a 10% do tensoativo em três ovos com os resultados da observação das gravações, ou seja, quantos seg foram observados para cada fenômeno na seguinte fórmula:

$$ES = \frac{301 - \text{segundos H}}{300} \times 5 + \frac{301 - \text{segundos L}}{300} \times 7 + \frac{301 - \text{segundos C}}{300} \times 9$$

H: Hemorragia

L: Lise vascular

C: Coagulação

Para a classificação do potencial irritante foi utilizada a média aritmética do ES dos três ovos da solução a 10%, bem como a média da concentração limite, de acordo com o **Quadro 5**.

Quadro 5 – Parâmetros para classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no teste HET-CAM¹.

Concentração Limite (TH)	Escore de Irritação (ES) (10%)	Classificação
TH < 1%		severo/corrosivo
1,0 < TH < 2,5	> 16	severo/corrosivo
2,5 < TH < 10,0	< 16	severo/corrosivo
1,0 < TH < 2,5	< 16	irritante
2,5 < TH < 10,0	>16	irritante
2,5 < TH < 10,0	< 16	irritante
2,5 < TH < 10,0	< 16	moderado
10,0 < TH	> 16	moderado
10,0 < TH	< 16	moderado
10,0 < TH	< 16	sem reação

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

Fonte: (INVITTOX, 1992).

Antes do início de cada série de testes, foram realizados, em dois ovos do mesmo lote dos ovos utilizados no estudo, o controle negativo e controle positivo que tem por objetivo verificar a qualidade dos ovos. Foi determinado o ES para os dois controles positivos, SDS 1% e NaOH 0,1% e para o controle negativo NaCl 0,9%. Ambos os controles tiveram o resultado de acordo com o preconizado no Protocolo Alemão em todos os experimentos e repetições:

SDS 1% = ES de 10 ± 2

NaOH 0,1% = ES de 15 ± 3

NaCl 0,9% = ES de 0 ± 3 .

3.4.4 HET-CAM – Protocolo Adaptado

Para a realização do protocolo adaptado foram utilizados quatro ovos para cada amostra da solução teste (controle positivo, controle negativo e tensoativos) e cada experimento foi repetido três vezes.

Foram adicionadas 300 μ L da solução teste cuidadosamente sobre a CAM com micropipeta por 5 min, sem a etapa de lavagem. A solução teste foi aquecida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes do uso. Os fenômenos foram gravados com o auxílio do *software* ISCapture Imaging Application 86x - TUCSEN[®] ligado a uma Lupa estereoscópica (BEL[®] Photonics – LED-60T) aumento de 7x (ajustes para maior nitidez da imagem podem ser necessários) e câmera (TUCSEN[®] – USB2.0 HSeries modelo ISH500) por 5 min sem interrupção, posteriormente, pela gravação, foram observados os fenômenos hiperemia, hemorragia e coagulação; registrados de acordo com a sua presença e graduados conforme protocolo francês no **Quadro 3** acima descrito.

A classificação final do tensoativo se deu através da média da pontuação dos quatro ovos onde: 0,0 a 0,9 - Não Irritante (NI); 1,0 a 4,9 - Irritante Leve (IL); 5,0 a 8,9 - Irritante Moderado (IM) e 9,0 a 21,0 - Irritante Severo (IS), conforme protocolo francês, conforme **Quadro 4** acima descrito.

3.5 Análise Estatística

Para a análise estatística foi montada uma tabela de contingência, calculando-se a sensibilidade, especificidade, precisão, resultados falso-positivos e resultados falso-negativos do teste *in vitro* com relação ao teste *in vivo*, observando-se a

frequência de concordância e discordância de resultados entre os ensaios, como se pode observar a seguir:

		<i>IN VIVO</i>	
		I	NI
<i>IN VITRO</i>	I	a	b
	NI	c	d

* NI = não irritante; I = irritante.

Onde:

- 1) Sensibilidade é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos positivos (irritantes) = $a / (a+c) \times 100\%$;
- 2) Especificidade é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos negativos (não irritantes) = $d / (b+d) \times 100\%$;
- 3) Precisão é a capacidade da metodologia *in vitro* fornecer os mesmos resultados que o teste *in vivo* = $(a+d) / (a+b+c+d) \times 100\%$;
- 4) Resultados falso-positivos é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos negativos (não irritantes) como produtos positivos (irritantes) = $b / b+d \times 100\%$;
- 5) Resultados falso-negativos é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos positivos (irritantes) como produtos negativos (não irritantes) = $c / a+c \times 100\%$;

4 RESULTADOS

No teste de Draize, onze tensoativos foram classificados como não irritantes (50,0%), quatro como irritantes leves (18,0%), três como irritantes moderados (14,0%) e quatro como irritantes severos (18,0%) (**Tabela 1**).

No teste HET-CAM protocolo francês: três tensoativos foram classificados como não irritantes (14,0%), dois como irritantes leves (9,0%), três como irritantes moderados (14,0%) e quatorze como irritantes severos (64,0%). No HET-CAM protocolo alemão: um tensoativo foi classificado como não irritante (4,5%), cinco como irritantes (23,0%), e dezesseis como irritantes severos/corrosivos (73,0%), (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Resultados dos testes de irritação ocular pelo teste de Draize, HET-CAM¹ protocolo francês² e HET-CAM¹ protocolo alemão³.

PRODUTO TENSOATIVOS		RESULTADOS		
		CLASSIFICAÇÃO TESTE DE DRAIZE	CLASSIFICAÇÃO HET-CAM FRANCÊS	CLASSIFICAÇÃO HET-CAM ALEMÃO
1	Lauril Sulfato de Sódio 15%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo
	Lauril Sulfato de Sódio 8%	Irritante Moderado	Irritante Severo	
	Lauril Sulfato de Sódio 4%	Não Irritante	Irritante Severo	
	Lauril Sulfato de Sódio 2%	Não Irritante	Irritante Severo	
	Lauril Sulfato de Sódio 0,25%	Não Irritante	Irritante Moderado	
2	Cloreto de Benzalcônio 1%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo
	Cloreto de Benzalcônio 0,5%	Irritante Moderado	Irritante Severo	
	Cloreto de Benzalcônio 0,25%	Não Irritante	Irritante Severo	
3	Triton X-100 30%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo
	Triton X-100 1%	Irritante Leve	Irritante Severo	
	Triton X-100 0,5%	Não Irritante	Irritante Severo	
4	Tween-20 30%	Não Irritante	Irritante Severo	Irritante
	Tween-20 1%	Não Irritante	Irritante Leve	
5	Álcool Cetoestearílico a 10%	Não Irritante	Não Irritante	Não Irritante
6	SPAN 80 0,5%	Não Irritante	Não Irritante	Irritante
	SPAN 80 0,25%	Não Irritante	Não Irritante	
7	Lauril Éter Sulfato de Sódio 30%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo
	Lauril Éter Sulfato de Sódio 10%	Irritante Leve	Irritante Severo	
	Lauril Éter Sulfato de Sódio 5%	Não Irritante	Irritante Severo	
8	Lauril Poliglucosídeo 10%	Irritante Leve	Irritante Moderado	Irritante
9	Brometo Cetil Dimetil Amonio 0,5%	Irritante Moderado	Irritante Moderado	Severo/Corrosivo
	Brometo Cetil Dimetil Amonio 0,25%	Irritante Leve	Irritante Leve	

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. ²FRANÇA, 1996. ³INVITTOX, 1992.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Para o protocolo adaptado foram obtidos os seguintes resultados: três tensoativos foram classificados como não irritantes (14,0%), um como irritante leve (4,0%), quatro como irritantes moderados (18,0%) e quatorze como irritantes severos (64,0%).

Na **Tabela 2** estão apresentados os resultados obtidos referentes aos resultados do protocolo adaptado com os do teste de Draize.

Tabela 2 - Resultados dos testes de irritação ocular pelo teste de Draize e HET-CAM¹ protocolo adaptado.

PRODUTOS TENSOATIVOS	RESULTADOS		
	CLASSIFICAÇÃO TESTE DE DRAIZE	CLASSIFICAÇÃO HET-CAM Adaptado	
1	Lauril Sulfato de Sódio 15%	Irritante Severo	Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 8%	Irritante Moderado	Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 4%	Não Irritante	Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 2%	Não Irritante	Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 0,25%	Não Irritante	Irritante Severo
2	Cloreto de Benzalcônio 1%	Irritante Severo	Irritante Severo
	Cloreto de Benzalcônio 0,5%	Irritante Moderado	Irritante Severo
	Cloreto de Benzalcônio 0,25%	Não Irritante	Irritante Severo
3	Triton X-100 30%	Irritante Severo	Irritante Severo
	Triton X-100 1%	Irritante Leve	Irritante Severo
	Triton X-100 0,5%	Não Irritante	Irritante Severo
4	Tween-20 30%	Não Irritante	Irritante Moderado
	Tween-20 1%	Não Irritante	Irritante Moderado
5	Álcool Cetoestearílico a 10%	Não Irritante	Não Irritante
6	SPAN 80 0,5%	Não Irritante	Não Irritante
	SPAN 80 0,25%	Não Irritante	Não Irritante
7	Lauril Éter Sulfato de Sódio 30%	Irritante Severo	Irritante Severo
	Lauril Éter Sulfato de Sódio 10%	Irritante Leve	Irritante Severo
	Lauril Éter Sulfato de Sódio 5%	Não Irritante	Irritante Severo
8	Lauril Poliglucosídeo 10%	Irritante Leve	Irritante Moderado
9	Brometo Cetil Dimetil Amonio 0,5%	Irritante Moderado	Irritante Moderado
	Brometo Cetil Dimetil Amonio 0,25%	Irritante Leve	Irritante Leve

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Na análise estatística com a tabela de contingência, essa comparação demonstrou que tanto o protocolo francês quanto o alemão foram capazes de identificar corretamente todos os tensoativos irritantes, classificados dessa maneira no teste de Draize, sendo bem sensíveis, ambos apresentaram sensibilidade de 100,0%. O valor de resultados falso-positivos é muito grande, ficando claro que o HET-CAM superestima os resultados (**Tabelas 3 e 4**).

No teste de Draize os produtos ou substâncias com o resultado irritante leve são considerados aprovados, sendo assim, para a tabela de contingência, consideramos como não irritantes (NI) os resultados não irritante e irritante leve; e irritantes (I) os resultados irritante moderado, irritante severo e severo/corrosivo.

Tabela 3 – Tabela de Contingência dos testes de Draize e HET-CAM¹ protocolo francês².

Draize x HET-CAM Francês			
TABELA DE CONTINGÊNCIA			
		IN VIVO	
		I	NI
IN VITRO	I	7	10
	NI	0	5
Sensibilidade:		100%	
Especificidade:		33%	
Precisão (Acurácia):		55%	
Resultados Falso-Positivos:		67%	
Resultados Falso-Negativos:		0%	

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. ²FRANÇA, 1996.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Tabela 4 – Tabela de contingência dos testes de Draize e HET-CAM¹ protocolo alemão².

Draize x HET-CAM Alemão			
TABELA DE CONTINGÊNCIA			
		IN VIVO	
		I	NI
IN VITRO	I	7	14
	NI	0	1
Sensibilidade:		100%	
Especificidade:		7%	
Precisão (Acurácia):		36%	
Resultados Falso-Positivos:		93%	
Resultados Falso-Negativos:		0%	

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. ²INVITTOX, 1992.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Na **Tabela 5** podem ser observados os resultados do teste de contingência envolvendo o teste de Draize e o protocolo adaptado. Essa comparação demonstrou que o protocolo adaptado foi capaz de identificar todos os tensoativos irritantes, apresentando uma sensibilidade de 100,0%, como os dois protocolos anteriores.

Tabela 5 – Tabela de Contingência dos testes de Draize e HET-CAM¹ protocolo adaptado.

Draize x HET-CAM Adaptado			
TABELA DE CONTINGÊNCIA			
		IN VIVO	
		I	NI
IN VITRO	I	7	11
	NI	0	4
Sensibilidade:		100%	
Especificidade:		27%	
Precisão (Acurácia):		50%	
Resultados Falso-Positivos:		73%	
Resultados Falso-Negativos:		0%	

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Foram também comparados, todos os resultados encontrados na tabela de contingência (**Tabela 6**), demonstrando que o protocolo adaptado teve resultados bem próximos aos outros protocolos, sendo assim é um bom candidato a substituir os outros dois protocolos. Na **Tabela 7** estão os resultados de todos os testes.

Tabela 6 – Comparação de todos os resultados da tabela de contingência pela aplicação dos testes de Draize, HET-CAM¹, HET-CAM protocolo francês² protocolo alemão³ e HET-CAM protocolo adaptado.

COMPARAÇÃO - Tabela de Contingência			
Parâmetros	Draize x HET-CAM Francês	Draize x HET-CAM Alemão	Draize x HET-CAM Adaptado
Sensibilidade	100%	100%	100%
Especificidade	33%	7%	27%
Precisão (Acurácia)	55%	36%	50%
Resultados Falso-Positivos	67%	93%	73%
Resultados Falso-Negativos	0%	0%	0%

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. ²FRANÇA, 1996. ³INVITTOX, 1992.

Fonte: (Registro feito pela autora).

Tabela 7 - Resultados dos testes de irritação ocular pelo teste de Draize, HET-CAM¹ protocolo francês², HET-CAM protocolo alemão³ e HET-CAM protocolo adaptado.

PRODUTOS TENSOATIVOS		RESULTADOS			
		CLASSIFICAÇÃO TESTE DE DRAIZE	CLASSIFICAÇÃO HET-CAM FRANCÊS	CLASSIFICAÇÃO HET-CAM ALEMÃO	CLASSIFICAÇÃO HET-CAM Adaptado
1	Lauril Sulfato de Sódio 15%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo	Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 8%	Irritante Moderado	Irritante Severo		Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 4%	Não Irritante	Irritante Severo		Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 2%	Não Irritante	Irritante Severo		Irritante Severo
	Lauril Sulfato de Sódio 0,25%	Não Irritante	Irritante Moderado		Irritante Severo
2	Cloreto de Benzalcônio 1%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo	Irritante Severo
	Cloreto de Benzalcônio 0,5%	Irritante Moderado	Irritante Severo		Irritante Severo
	Cloreto de Benzalcônio 0,25%	Não Irritante	Irritante Severo		Irritante Severo
3	Triton X-100 30%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo	Irritante Severo
	Triton X-100 1%	Irritante Leve	Irritante Severo		Irritante Severo
	Triton X-100 0,5%	Não Irritante	Irritante Severo		Irritante Severo
4	Tween-20 30%	Não Irritante	Irritante Severo	Irritante	Irritante Moderado
	Tween-20 1%	Não Irritante	Irritante Leve		Irritante Moderado
5	Álcool Cetoestearílico a 10%	Não Irritante	Não Irritante	Não Irritante	Não Irritante
6	SPAN 80 0,5%	Não Irritante	Não Irritante	Irritante	Não Irritante
	SPAN 80 0,25%	Não Irritante	Não Irritante		Não Irritante
7	Lauril Éter Sulfato de Sódio 30%	Irritante Severo	Irritante Severo	Severo/Corrosivo	Irritante Severo
	Lauril Éter Sulfato de Sódio 10%	Irritante Leve	Irritante Severo		Irritante Severo
	Lauril Éter Sulfato de Sódio 5%	Não Irritante	Irritante Severo		Irritante Severo
8	Lauril Poliglucosídeo 10%	Irritante Leve	Irritante Moderado	Irritante	Irritante Moderado
9	Brometo Cetil Dimetil Amonio 0,5%	Irritante Moderado	Irritante Moderado	Severo/Corrosivo	Irritante Moderado
	Brometo Cetil Dimetil Amonio 0,25%	Irritante Leve	Irritante Leve		Irritante Leve

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. ²FRANÇA, 1996. ³INVITTOX, 1992.

Fonte: (Registro feito pela autora).

No **Quadro 6** são mostradas todas as diferenças dos protocolos, relacionando com a otimização feita com o protocolo adaptado.

Quadro 6: Diferenças de cada protocolo no ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)

	Protocolo Francês ¹	Protocolo Alemão ²	Protocolo adaptado
Origem dos ovos	LEGHORN SPF	LEGHORN SPF	LEGHORN SPF
Número de ovos	4	3	4
Tempo de contato	20 seg	5 min	5 min
Observação	Olho nú	Captura de vídeo	Captura de vídeo
Lesões observadas	Hiperemia, Hemorragia e Coagulação	Hemorragia, Lise vascular e Coagulação	Hiperemia, Hemorragia e Coagulação
Como se chega na classificação	Média aritmética da pontuação de cada lesão encontrada nos quatro ovos	Média aritmética do escore de irritação (IS) e da concentração limite (TH)	Média aritmética da pontuação de cada lesão encontrada nos quatro ovos
Classificação final	Não irritante Irritante leve Irritante moderado Irritante severo	Sem reação Moderado Severo Severo/corrosivo	Não irritante Irritante leve Irritante moderado Irritante severo

¹FRANÇA, 1996. ²INVITTOX, 1992.

Fonte: (Registro feito pela autora).

5 DISCUSSÃO

O crescente número de novos produtos químicos, cosméticos, farmacêuticos, entre outros, provenientes de diversas indústrias, precisam atender a um criterioso grau de exigência quanto à comprovação da segurança do usuário antes de serem introduzidos no mercado. Com isso aumenta a quantidade de testes juntamente com a necessidade de desenvolver técnicas, métodos alternativos, capazes de detectar possíveis efeitos de irritação ocular.

Com os resultados encontrados nos dois protocolos fica claro que o teste HET-CAM tende a superestimar os resultados quando comparado ao teste de Draize, o que é corroborado por diversos artigos. Artigos sobre avaliação da irritação ocular provocada por colírios, demonstraram também que o HET-CAM superestimou os resultados e que provavelmente se deve pelo fato do produto ser aplicado diretamente na membrana corioalantóide e pela fragilidade dos capilares sanguíneos (NÓBREGA et al, 2012; OLIVEIRA et al, 2012). Shampoos foram testados no teste HET-CAM e foi demonstrada uma alta taxa de resultados corretos de não irritantes, mas foi possível diferenciar com segurança os resultados irritantes ou irritantes graves (DEROUICHEA; ABDENNOURB, 2017).

Segundo os estudos de Spielmann (1997) e Steiling et al (1999), foi demonstrada uma boa correlação entre o teste HET-CAM e o teste de Draize para a avaliação de matérias-primas e produtos cosméticos, revelando bons resultados para produtos irritantes leves e não irritantes.

O teste HET-CAM passou por vários estudos de validação como: estudos colaborativos (Bagley et al, 1992; Rougier et al, 1992), programas nos EUA da Associação de Higiene Pessoal e Fragrâncias (CTFA - *Cosmetic Toiletry and Fragrance Association*) (Gettings et al, 1991, 1994, 1996); estudos de validação independentes na Europa pelo COLIPA (Brantom et al, 1997; Steiling et al, 1999); na Alemanha pelo Ministério de Pesquisa e Tecnologia (BMFT - *Ministerium für Forschung und Technologie*) e Agência Federal de Saúde (BGA - *Bundesgesundheitsamt*) (Spielmann et al, 1991, 1993, 1995, 1996); na França pela associação francesa para o bem-estar dos animais de laboratório (OPAL - *Oeuvre Pour l'Assistance aux Animaux de Laboratoire*). (Blein et al, 1991) e no Japão onde foi realizado um estudo interlaboratorial do Ministério da Saúde e Bem-Estar (MHW - *Japanese Ministry of Health and Welfare*) em conjunto com a Associação da Indústria de Cosméticos (Hagino et al, 1999). O teste HET-CAM também foi incluído no estudo

mundial de validação (EC/HO - European Commission/British Home Office) (Balls et al, 1995).

Como parte de um processo de avaliação, o ICCVAM preparou um documento de revisão de antecedentes (BRD - Background Review Document) para descrever o *status* da validação do teste HET-CAM com base em dados e informações disponíveis em diversos estudos. Pelos resultados obtidos, o teste HET-CAM superestimou a maioria das substâncias classificadas como não irritantes. A taxa de falso positivos foi alta enquanto a taxa de falso negativo para quase todas as substâncias foi zero, com isso a precisão do ensaio foi baixa, mas a sensibilidade ficou em 100%. Nenhum protocolo único do teste HET-CAM obteve ampla aceitação como padrão. Não ocorreu uma boa reprodutibilidade interlaboratorial, talvez pela subjetividade do ensaio. E concluiu que o teste HET-CAM não é adequado para identificar substâncias corrosivas oculares e irritantes graves, porém teve um melhor desempenho ao avaliar substâncias não irritantes, com potencial de reduzir e refinar o uso de animais nos testes de irritação ocular em uma estratégia de teste em camadas (ICCVAM, 2010).

Durante a pesquisa bibliográfica foi constatado que existem mais estudos utilizando o protocolo francês. Foram encontrados dois artigos que utilizavam toda a metodologia do protocolo alemão, porém foi usada a classificação do protocolo francês (SPIELMANN et al, 1991; 1997).

Diante da constatação de que não existiam estudos comparando os protocolos alemão e francês, tornou-se um desafio de extrema importância a realização desse estudo a fim de harmonizar as informações e caminhar para a próxima etapa da validação do teste HET-CAM.

Os protocolos francês e alemão possuem diferenças metodológicas significativas conforme **Quadro 7**. Neste estudo foi realizada uma comparação dessas diferenças com base nos resultados obtidos nesses ensaios com os tensoativos nos dois protocolos junto aos resultados do teste de Draize, referenciado como padrão ouro.

Quadro 7 – Diferenças metodológicas – teste HET-CAM¹

Diferenças Metodológicas – teste HET-CAM	
Protocolo Francês	Protocolo Alemão
O produto é lavado após 20 seg de contato com a CAM ² .	O produto fica em contato com a CAM durante os 5 min.
Substâncias puras e suas diluições podem ser testadas.	Para definir a classificação final são utilizados apenas os dados da substância na diluição de 10% e a concentração limite.
O ensaio é realizado a olho nu.	O ensaio é realizado sob uma lupa estereoscópica (BEL [®] Photonics – LED-60T) aumento de 7x (ajustes para maior nitidez da imagem podem ser necessários) e câmera (TUCSEN [®] – USB2.0 HSeries modelo ISH500) e gravado com o auxílio do <i>software</i> ISCapture Imaging Application 86x - TUCSEN [®] .

¹Ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. ²CAM: membrana corioalantóide
Fonte: (Registro feito pela autora).

As diferenças dos parâmetros possuem aspectos poucos elucidativos como:

a) No protocolo francês, a realização do ensaio a olho nu cria uma subjetividade nas leituras obtidas; possuir uma etapa que exige mais cuidado que é a de enxague após os 20 segundos de aplicação da amostra; e o fato de não ter nenhuma forma de verificar posteriormente os resultados. São diferenças que podem dificultar uma reprodutibilidade interlaboratorial;

b) No protocolo alemão, a concentração limite é estabelecida empiricamente, não parte de um critério objetivo dependendo exclusivamente da observação técnica para sua definição; existe um padrão, que não pode ser modificado, para se definir a classificação final utilizando apenas os dados da substância na diluição de 10% e a concentração limite; gradua a lise vascular que aparentemente, com base na observação, parece não haver. Serão necessários mais estudos comprobatórios realizados em um outro momento. Também não gradua a hiperemia/congestão, que é o começo do processo inflamatório. O que justifica a manutenção do protocolo francês na sua maioria, pois ele acompanha melhor a evolução do processo inflamatório.

Com relação à comparação dos resultados, ambos os protocolos foram capazes de identificar corretamente todos os tensoativos classificados como irritantes

no teste de Draize, apresentando sensibilidade de 100%, não existindo diferença significativa nos dois protocolos

Com base em todos os resultados encontrados, foi realizada uma otimização do protocolo francês gerando um protocolo adaptado, com capacidade de classificar as substâncias e suas diluições. A utilização da lupa estereoscópica (BEL® Photonics – LED-60T), câmera (TUCSEN® – USB2.0 HSeries modelo ISH500) e do *software* (ISCapture Imaging Application 86x - TUCSEN®) nos permitiu o monitoramento em tempo real do ensaio. A filmagem do teste mantém os arquivos gravados que podem ser analisados posteriormente por qualquer analista. Os resultados podem ser revisados antes da liberação dos resultados e o analista poderá parar a gravação sempre que necessário, reduzindo assim a subjetividade na avaliação, garantindo resultados mais precisos e um maior controle da qualidade. E para evitar a perda da imagem foi retirada a etapa de lavagem nos 20 seg de teste, pois assim o ovo não é retirado do campo de imagem permitindo uma filmagem completa de todo o ensaio.

Para a conclusão do resultado final de uma substância o importante não é a intensidade das lesões, mas, sim, o momento em que as mesmas aparecem. Quando as lesões aparecem no meio do intervalo temporal, não faz diferença, entretanto, quando elas surgem próximas do tempo limite entre as faixas temporais, a acuidade e experiência do observador contam muito e isso pode alterar drasticamente a classificação. Por este motivo, o uso da captura de imagem é importante aliada, pois, juntamente com o cronômetro na tela, pode-se marcar com maior precisão o momento em que surgem as lesões.

Para obter a substituição completa do teste de Draize, um método alternativo isoladamente ou em combinação, precisa abordar os principais efeitos do tecido ocular que determinam a classificação, para tal um entendimento profundo do que impulsiona a classificação de produtos químicos no teste de Draize é um elemento crítico e essencial a ser considerado no desenvolvimento de métodos alternativos, na avaliação de sua capacidade e limitações preditivas e na identificação da aplicabilidade de um ensaio específico (BARROSO et al, 2017). O teste HET-CAM é um ótimo candidato a participar de uma combinação de testes, ou seja, compor uma estratégia de teste como sugerido por Scott et al, 2010.

Os resultados desse estudo também demonstraram que o teste HET-CAM com o protocolo adaptado é altamente sensível e confiável, capaz de identificar com precisão os produtos não irritantes sendo um ótimo candidato para compor uma estratégia de teste *Bottom-up*, ou seja, uma bateria de testes começando de baixo

para cima. Ou seja, para analisar um produto, podemos começar com o teste HET-CAM, se o resultado indicar não irritante, não será necessário realizar outros testes, mas se o resultado for diferente deverá ser realizado outro teste que poderia ser, por exemplo, o BCOP que é capaz de identificar também os produtos severos irritantes e corrosivos.

O HET-CAM está atualmente em processo de validação internacional pelo BraCVAM, onde demonstrou uma boa aplicabilidade para produtos não irritantes na fase de pré-validação seguindo o protocolo francês. Na próxima fase da validação poderemos propor o uso desse protocolo adaptado.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir:

- Não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos nos dois protocolos;
- A utilização da filmagem dá uma garantia maior e melhor de visualização, possibilitando a revisão do arquivo de trabalho, permitindo uma maior acuidade em termos dos tempos em que ocorrem as lesões, contribuindo para um resultado mais fidedigno;
- A otimização do HET-CAM no protocolo francês não altera o resultado final, já que foi obtido o mesmo resultado com o protocolo original. A adaptação vem para melhorar a qualidade de execução e garantir o arquivamento e comprovação dos resultados dos ensaios permitindo o controle da qualidade mais seguro e eficaz;
- O protocolo adaptado é um bom candidato a método alternativo para compor uma estratégia *Bottom-up*, começando os testes com o uso de métodos que possam identificar os produtos não irritantes;

7 PRODUTO TECNOLÓGICO

POP referente ao teste proposto – HET-CAM adaptado (**Apêndice A**).

Título: Ensaio de Irritação Ocular – Método HET-CAM

Objetivo

Este Procedimento Operacional Padronizado (POP) tem como objetivo fixar condições, padronizar, definir e estabelecer regras e recomendações para realização do Ensaio de Irritação Ocular – HET-CAM, produzido pela exposição tópica de uma substância ou produto através da observação e quantificação de reações que possam surgir na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. A metodologia empregada foi baseada nas diretrizes estabelecidas por França (1996) e protocolo 47 da INVITTOX (1992)

Campo de Aplicação

Este POP aplica-se a utilização no Ensaio de Irritação Ocular – método HET-CAM para detectar e avaliar o potencial irritante de qualquer substância ou produto que possa entrar em contato com o olho do homem.

O HET-CAM é um método alternativo aos ensaios em coelhos, para avaliar o potencial irritante de substâncias ou produtos. O princípio baseia-se na observação, por uma pessoa com experiência no método, dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e de coagulação) que podem ocorrer dentro de 5 min após a aplicação do produto químico, puro ou diluído, na membrana corioalantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação.

A CAM é um tecido completo contendo um sistema vascular (veias e artérias, capilares). Responde a lesão com um processo inflamatório semelhante ao que seria observado no tecido da conjuntiva de olho de coelho albino.

Utilizar como parte integrante de uma bateria de métodos “in vitro”, integrando os procedimentos da estratégia “Bottom-Up” (SCOTT et al, 2010).

REFERÊNCIAS

ALTWEB. **International alternatives organizations database**. 2009. Disponível em: <http://caat.jhsph.edu/international%5Falternatives>. Acesso em: 31 de ago. 2018.

BAGLEY, D. M. et al. Eye Irritation: Reference chemicals data bank. **Toxicology In Vitro**, v. 6, p. 487-491, 1992.

BALLS, M.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; SPIELMANN, H. The EC/HO International Validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. **Toxicology In Vitro**, v. 9, p. 871-929, 1995.

BALLS, M.; STRAUGHAN, D.W. The 3Rs of Russel & Burch and the testing of biological products. In: BROWN F., CUSSLER K., HENDRIKSEN C. (Eds). Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products. **Dev. Biol. Stand.**, v. 86, p. 11-18, 1996.

BALLS, M. **The Three Rs and the Humanity Criterion**. Nottingham, UK: FRAME, 2009.

BARROSO, J. et al. Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/ eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). **Archives of Toxicology** 91, p.521–547, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1679-x>. Acesso em: 02 dez. 2019.

BLEIN, O. et al. Correlation and validation of alternative methods to the Draize eye irritation test (OPAL PROJECT). **Toxicology In Vitro**, v. 5, p. 555-557, 1991.

BRANTOM, P. G. et al. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicology In Vitro**, v. 11, p. 141-179, 1997.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 set 1976. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6360.htm#art88. Acesso em: 13 jan. 2020.

BRASIL. Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 maio 1979. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1970-1979/L6638.htm. Acesso em: 13 jan. 2020.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Capítulo VI, Do Meio Ambiente, Art.225, § 1º, alínea VII. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 out 1988. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em: 13 jan. 2020.

BRASIL. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 set.1990a. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8078.htm. Acesso em: 17 jul. 2018.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, de 20 de setembro de 1990, Brasília, DF, 20 set. 1990b. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm. Acesso em: 18 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.428, de 26 de novembro de 1993. Estabelecer as orientações necessárias que permitam executar as atividades de , inspeção sanitária, da farsa a avaliar as " Boas Práticas para a obtenção de padrões de identidade • qualidade de produtos e serviço. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 dez. 1993. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/PRT_MS_1428_1993.pdf/a6e93af4-d939-4a80-9ee1-2fdb78dce2ee. Acesso em: 18 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.565, de 26 de agosto de 1994. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e sua abrangência, esclarece a distribuição da competência material e legislativa da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios e estabelece procedimentos para articulação política e administrativa das três esferas de governo do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 ago. 1994. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1994/prt1565_26_08_1994.html. Acesso em: 18 jul. 2018.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 fev. 1998a. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm. Acesso em: 13 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 295, de 16 de abril de 1998. Estabelece Critérios para Inclusão, Exclusão e Alteração de Concentração de Substâncias utilizadas em Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 abr. 1998b. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/PRT_SVS_296_1998.pdf/ef3798c4-7c09-4de9-b9cf-ced4c6883d3c. Acesso em: 18 jul. 2018.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Dispõe sobre a definição do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9782.htm. Acesso em: 18 jul. 2018.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII de parágrafo 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n. 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 out. 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm. Acesso em: 18 jul. 2018.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm. Acesso em: 18 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 jul. 2012a. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/bracvam/Portaria_491_cria_RENAMA.pdf. Acesso em: 31 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2ª Edição. Brasília, DF, 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto Nº 8.077, de 14 de agosto de 2013. Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário, e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos de que trata a lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014a. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 jul. 2014a, Seção 1, p. 51.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 set. 2014b, Seção 1, p. 9.

BRASIL. Projeto de Lei da Câmara nº 70, de 2014c. Altera dispositivos dos arts. 14, 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, para dispor sobre a vedação da utilização de animais em atividades de ensino, pesquisas e testes laboratoriais com substâncias para o desenvolvimento de produtos de uso cosmético em humanos e aumentar os valores de multa nos casos de violação de seus dispositivos. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/118217>. Acesso em: 25 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 fev. 2015a. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867685/RDC_07_2015_.pdf/ Acesso em: 31 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 35, de 7 de agosto de 2015. *Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA*. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 ago. 2015b. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_35_2015_.pdf/e96e3d5d-0572-4e50-8b76-561223a23b80?version=1.0. Acesso em: 31 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 ago. 2016a, Seção 1, p. 4.

BRASIL. Decreto Nº 8.932, de 14 de dezembro de 2016. Aprova o Estatuto e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções de Confiança da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, remaneja cargos em comissão e funções de confiança, substitui cargos em comissão do Grupo Direção e Assessoramento Superiores - DAS por Funções Comissionadas do Poder Executivo – FCPE. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 dez. 2016b, Seção 1, p. 20.

BRASIL. Resolução nº 588 de 12 de julho de 2018. Fica instituída a Política Nacional de Vigilância em Saúde (PNVS). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 ago. 2018, Seção 1, p. 87.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 45, de 22 de outubro de 2019. Reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 out. 2019, Seção 1, p. 14.

BURTON, A. B. G.; YORK, M.; LAWRENCE, R. S. The in vitro assessment of severe irritants. **Food and Cosmetics Toxicology**, [S.l.]. v. 9, p. 471-480, 1981.

CHAMBERS, W.A.; GREEN, S.; GUPTA, K.C. Scoring for eye irritation tests. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, p. 111-115, 1993.

CHAN, P.K.; HAYES, A.W. Acute toxicity and eye irritation, in Heyes AW (ed): **Principles and Methods of Toxicology**. New York, Raven Press. p. 579-647, 1994.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Establishment of a European Centre for the Validation of Alternative Methods (CEVMA)**. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. Belgium, 29 Oct.1991.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rozenfeld, S. (org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.

COSTA, R.N. Estudo da Aplicabilidade do Ensaio de Quantificação de Proteínas Totais em Células SIRC na Avaliação do Potencial de Irritação Ocular de Xampus e Tensoativos. 2006. 60p. **Tese (Mestrado em Saúde Pública)** – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

DA SILVA, A. C. P. O Laboratório Oficial na avaliação analítica. In: Rozenfeld S (org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.

DASTON, G.P.; FREEBERG, F.E. Ocular irritation testing, in Hobson DW (ed): **Dermal and Ocular Toxicology**. Fundamental and Methods. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 509-539, 1991.

DEROUICHEA M. T. T; ABDENNOURB S. Application to shampoos in developing countries. **Toxicology In Vitro**, v. 45, p. 393-396, 2017.

DE TORRES, E. P; LARRAURI, A. G; KUHN, G. R. Ensayos alternativos a la experimentación animal. **Animales de Experimentación**. v. 3(2), p. 30-36, 1997.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, [S.I.], v. 83, p. 377-390, 1944. Disponível em: <http://jpet.aspetjournals.org/content/jpet/82/3/377.full.pdf>. Acesso em 23 jul. 2018.

DRAIZE, J. H. Dermal toxicity. **Appraisal of the safety chemicals in foods, drugs and cosmetics**. Austin, Tex., Association of Food and Drug Officials of the United States, p. 46-59, 1959.

EEC. Commission Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. **Official Journal of the European Communities**. L 262, 27 Sept. 1976. p. 169-200. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:31976L0768>. Acesso em: 07 ago. 2018.

EEC. Commission Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. **Official Journal of the European Communities**. L 358, 18 Dec. 1986. p. 1-28. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX:31986L0609>. Acesso em: 07 ago. 2018.

EC. Commission Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. **Official Journal of the European Communities**. L 66, 11 Mar. 2003. p. 26-35. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=CELEX%3A32003L0015>. Acesso em: 07 ago. 2018.

EC. Commission Directive. Regulation (EC) 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. **Official Journal of**

the European Communities. L 342. 22 Dec. 2009. p. 59-209. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>. Acesso em: 07 ago. 2018.

EU. Commission Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. **Official Journal of the European Communities.** L. 276. 20 Oct. 2010. p. 33-79. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>. Acesso em: 08 ago. 2018.

EUROPA. Notes of guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation. **The rules governing cosmetic products in the European Union. Cosmetic products Guidelines**, v. 3. European Commission, 1999.

EUN, H. C.; SUH, D. H. Comprehensive outlook of in vitro test for assessing skin irritancy as alternatives to Draize Test. **Journal of dermatological Science** 2000; v. 24, p. 77-91, 2000.

FRANÇA. ARRÊTÉ du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques. **Journal Officiel de la République Française - JORF**, Paris, n. 300, 26 déc. 1996. 19137-19138.

GETTINGS S. et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase 1) hydro-alcoholic formulations; (Part 2) data analysis and biological significance. **Toxicology In Vitro**, v. 4, p.247-288, 1991.

GETTINGS S. et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase II) oil/water emulsions. **Food Chem Toxicol**, v. 32, p. 943-976, 1994.

GETTINGS S. et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) surfactant-based formulations. **Food Chem Toxicol**, v. 34, p. 79-117, 1996.

HAGINO S. et al. Interlaboratory Validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. Chorioallantoic Membrane (CAM) Test. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 99-113, 1999.

HAYASHI, K. *et al.* Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. **Toxicology In Vitro** v. 26, p. 1199-1208, oct. 2012.

ICCVAM. Background Review Document: Current status of *in vitro* test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: **Hen's egg test - chorioallantoic membrane test method**. NIH Publications N° 06-4515. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/ocular/in-vitro/brd/index.html>. Acesso em: 26 set. 2018.

ICCVAM. About the **Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)**, 2008. Disponível em:

<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/iccvam/index.html>. Acesso em: 30 ago. 2018.

ICCVAM. Background Review Document Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. **National Toxicology Program**, 2010.

ILAR - INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH. Science, Medicine and Animals. **The National Academies Press**; 2004.

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. Atividades institucionais 2005-2008. Rio de Janeiro, 2009. p.107.

INVITTOX. 1992. Protocol N° 47: **HET-CAM Test**. Disponível em: https://http://ecvam-sis.jrc.it/invittox/published/indexed_47.html. Acesso em: 15 ago. 2018. ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol HET-CAM Test.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Ensaio de Irritação ocular. Seção 4.3 (n° 65.3330.004). **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ; 2014.

KAY, J. H.; CALANDRA, J. C. Interpretation of eye irritation tests. **J. Soc. Cosmt. Chem.** v. 13, p. 281-289, 1962.

KELS, B. D.; GRZYBOWSKI, A.; KELS, J. G. Human ocular anatomy. **Clinics in Dermatology**. v. 33, p. 140-146, abr. 2015.

KURIAN, G. **The Historical Guide to American Government**. New York: Oxford University Press; 1998.

LEIGHTON, J.; NASSAUER, J.; TCHAO, R.; VERDONE, J. Development of a procedure using the chick egg as an alternative to the Draize rabbit test. In **Alternative Methods in Toxicity Testing**. Volume I. Prodtct Safer Evaluation. Edited by A. Goldberg. p. 165. M. A. Liebert, New York, 1983.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 23, p. 287-291, 1985.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test. An alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**. 1986, 24, n° 6/7, p. 495-496.

MASCHIO, J. J. **Os animais: direitos deles e ética para com eles**. Teresina, ano 10, n. 771, 13 ago. 2005. Disponível em: <https://jus.com.br/artigos/7142>. Acesso em: 13 jan. 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório**. Goiânia: AAALAC e COBEA, 2003.

NOBREGA, A. M.; ALVES, E.M.; PRESGRAVE, R.F.; COSTA, R.N.; DELGADO, I.F. Determination of eye irritation potencial of low-irritant products: comparison of in vitro results with the in vivo Draize rabbit test. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 3, p. 381-388, 2012.

OECD. **Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment**. Series on Testing and Assessment, Number 34. Paris, 2005. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2005\)14](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2005)14). Acesso em: 20 ago. 2018.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**. Test N° 405: Acute eye irritation/corrosion, section 4, OECD publishing, p. 19. Paris, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264185333-en>. Acesso em: 18 set. 2018.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**. Test N° 460: Fluorescein Leakage test method for identifying ocular corrosives and severe irritants, section 4, OECD publishing, p. 16. Paris, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264185401-en>. Acesso em: 18 set. 2018.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**. Test N° 437: bovine corneal opacity and permeability test method for identifying (i) chemicals inducing serious eye damage and (ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage, section 4, OECD publishing, p. 27. Paris, 2017c. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264203846-en>. Acesso em: 18 set. 2018.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**. Test N° 438: isolated chicken eye test method for identifying (i) chemicals inducing serious eye damage and (ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage, section 4, OECD publishing, p. 20. Paris, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264203860-en>. Acesso em: 20 set. 2018.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**. Test N° 491: Short time exposure in vitro test method for identifying (i) chemicals inducing serious eye damage and (ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage, section 4, OECD publishing, p 14. Paris, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264242432-en>. Acesso em: 20 set. 2018.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**. Test N° 492: reconstructed human cornea-like epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, section 4, OECD publishing, p 27. Paris, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264242548-en>. Acesso em: 20 out. 2019.

OLIVEIRA, A. G. L.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAMTBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71(1), p. 153-159, 2012.

PAIXÃO, R. L.; SCHRAMM, F. R. **Experimentação animal: razões e emoções para uma ética**. Niterói: Ed.UFF, 2008.

PAUWELS, M.; ROGIERS, V. Safety evaluation of cosmetics in the EU: Reality and changes for the toxicologist. **Toxicol. Letters**, v. 151, p. 7-17, 2004.

PAPE, W. J. W.; HOPPE, U. In vitro methods for the assessment of primary local effects of topically applied preparations. **Skin Pharmacology** 4, p. 205-212, 1991.

PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade, A.; Pinto, S.C.; Oliveira, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro. 2002: Editora Fiocruz. 2002.

PRESGRAVE, R. F.; MACHADO, D. O. S.; SABAGH, F. P. et al.. A proposal for classifying shampoos as irritant or non irritant using the Neutral Red Uptake assay. In: Abstracts of the 5th **WORLD CONGRESS ON ALTERNATIVES & ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES**; 2005 Aug 21-25; Berlin, Germany. **ALTEX**, v. 22, n. Spec. Issue, p. 172, 2005.

PRESGRAVE, O. A. F. The need of the establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). **ATLA**, v. 36, p. 705-708, 2008.

PRESGRAVE, O. A. F. Métodos alternativos. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Org.). **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009a.

PRESGRAVE, O. A. F. proposal of establishing a Brazilian center for validation of alternative methods (BraCVAM). **ALTEX**, [S.I.], n. 26, p. 19, 2009b. Número especial. Abstracts of the World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 7th, 2009b, Rome, Italy.

PRESGRAVE, O. A. F.; Caldeira, C.; Gimenes, I. et al. Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL, 2010, Minas Gerais, Brasil. **Anais...** Recife: Ciência Veterinária nos Trópicos, 2010a. p. 106-117.

PRESGRAVE, O.; ESKES, C.; PRESGRAVE, R. et al. A Proposal to Establish a Brazilian Center for Validation of Alternative Methods (BraCVAM). **ALTEX**, [S.I.], n. 27, p. 47, 2010b.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista Bioética**. 2002. Disponível em: <http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/196/199>. Acesso em: 13 jan. 2020.

REGULATION EC Nº 1223/2009 OF **THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL** of 30 November 2009 on cosmetic products.

RIORDAN, T. **Inventing Beauty**: A history of the innovations that have made us beautiful. Broadway Books; 2004.

ROUGIER A. et al. In vitro methods: their relevance and complementarity in ocular safety assessment. **Lens Eye Tox Res**, v. 9, p. 229-245, 1992.

SCOTT, L. et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using bottom-up and top-down approaches. **Toxicology in Vitro**, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.019>. Acesso em: 07 ago. 2018.

SPIELMANN H. et al. Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. **Toxicology in Vitro**, v. 5, p. 539-542, 1991.

SPIELMANN, H. HET-CAM Test. **The ERGATT/FRAME Databank of in vitro techniques (INVITTOX)**. p. 1-9, 1992.

SPIELMANN, H. et al. Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. **Toxicology In Vitro**, v. 7, p. 505-510, 1993.

SPIELMANN H. et al. 1996. Results of a validation study in Germany on two *in vitro* alternatives to the Draize eye irritation test, HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. **Altern Lab Anim**, v. 24, p. 741-858.

SPIELMANN, H; Ocular irritation. In: Castell, Gomez-Lechon (Eds.): **In vitro methods in pharmaceutical research**. Academic Press, London; 265-287; 1997.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; SILVA, O. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 375-384, 1999.

UNESCO - Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. **Declaração universal dos direitos dos animais**. Proclamada em sessão realizada em Bruxelas, em 27.5.1978.

United Kingdom. Guidance on the operation of the animals (Scientific Procedures) act 1986. London: HMSO, 1990. Disponível em: <https://www.gov.uk/guidance/guidance-on-the-operation-of-the-animals-scientific-procedures-act-1986>. Acesso em: 13 jan. 2020.

WILHELMUS, K. R. Therapeutic Reviews: the Draize Eye Test. **Survey of Ophthalmology**, v.45, n.6, p.393-397, 2001.

ANEXO A – ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR

Teste de Draize- *in vivo*:

Foram utilizados dados provenientes do banco de dados do DFT/INCQS. Os ensaios *in vivo* foram realizados segundo o POP n° 65.333.004 do INCQS/FIOCRUZ, cujo objetivo é a detecção e avaliação do potencial de irritabilidade para o homem de qualquer substância ou produto acabado que possa vir a entrar em contato com os olhos.

O teste de Draize permite cinco classificações dos produtos quanto ao seu potencial irritante ocular, são elas: não irritante (NI), irritante leve (IL), irritante moderado (IM), irritante severo (IS) e irritante máximo (IMax).

1) Animais: Coelhos albinos, machos ou fêmeas da raça “Nova Zelândia”, hípidos e com peso corpóreo acima de 2,0 Kg. Foram utilizados cinco animais por amostra/substância-teste.

2) Acondicionamento: Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar (30 – 70%) e ciclo claro/escuro constante (12 horas cada). Os animais receberam ração e água *ad libidum*.

3) Preparo dos animais: Ambos globos oculares de cada animal foram examinados 24 horas antes do início do ensaio. Os animais que apresentaram injúrias na conjuntiva e globo ocular foram descartados.

4) Aplicação: Instilou-se 0,1 mL do produto no saco conjuntival inferior e, em seguida massageou-se gentilmente durante 30 segundos. As substâncias ou produtos fortemente ácidos ou alcalinos (pH menor que 2,0 e maior que 11,5) não foram testados, pois são reconhecidamente corrosivos.

5) Leitura: Foram realizadas leituras, por três analistas, nos períodos de 24h, 48h, 72h e 7 dias, para a observação das alterações e graduação das lesões (**Quadro 1**).

6) Avaliação dos resultados: Foi dividida em etapa I e etapa II

ETAPA I:

1) Determinação da quantificação da lesão ocular

Este cálculo deve ser realizado para cada animal com base nas leituras de 24, 48, 72 h e 7 dias, conforme a graduação das lesões, segundo a equação abaixo e registrando-se os valores na ficha de soma das leituras para, em seguida, calcular a média aritmética de cada tempo de leitura.

$$Lxt = (A \times B) \times 5 + (C \times 5) + [(D + E + F) \times 2] \text{ Onde:}$$

Lxt – Leitura de um animal em um intervalo de tempo (t)

A – densidade da opacidade

B – área da opacidade

C – irite

D – hiperemia

E – quimose

F – secreção

2) Seleção da maior média aritmética entre as médias de 24, 48, 72 h (ME_{24h} , ME_{48h} , ME_{72h})

Seleciona-se a média de valor máximo (ME_{max}), e posteriormente calcula-se a faixa de confiança de acordo com a seguinte equação:

$$FC = ME_{max} \pm 5, \text{ onde:}$$

Fc – faixa de confiança;

ME_{max} – média aritmética de maior valor entre os tempos de 24h, 48h e 72h.

Uma vez selecionada a ME_{max} verifica-se se pelo menos dois valores de Lxt encontram-se dentro da Fc. Se tais valores forem encontrados, deve-se considerar o ME_{max} e utilizar a **tabela 1** referente à classificação inicial do produto.

Quadro 1. Graduação das alterações e lesões do globo ocular de coelhos após instilação no saco conjuntival inferior de 0,1mL de amostra/substância-teste.

Estrutura	Alteração	Graduação				
		0	1	2	3	4
Córnea	Opacidade Quanto à Densidade	Sem opacidade	Área difusa ou disseminada, detalhes da íris claramente visíveis (perda de brilho)	Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros	Área opalescente, nenhum detalhe da íris	Opaca, íris invisível
	Quanto à Área	Córnea normal	¼ (ou menos), mas não zero	Maior do que ¼ e menor que a metade	Maior do que a metade e menor do que ¾	Maior do que ¾ até a área total
Íris	Irite	Íris normal	Raias com congestão, edema, ingestão circuncorneal (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas), íris ainda reage à luz (reação lenta é positiva)	Nenhuma reação à luz, hemorragia, destruição (qualquer uma ou todas essas)		
Conjuntiva	Hiperemia	Vasos normais	Vasos definitivamente injetados acima do normal	Vermelho intenso mais difuso e vasos individuais não facilmente discerníveis	Vermelho escuro difuso	
	Quimose	Ausência de edema	Algum edema acima do normal (incluindo a membrana nictante)	Edema óbvio com eversão parcial das pálpebras	Edema com as pálpebras cobrindo a metade do olho	Edema com pálpebra cobrindo de metade ao fechamento total do olho
	Secreção	Ausência de secreção	Qualquer quantidade diferente do normal	Secreção com umedecimento das pálpebras e pelos adjacentes	Secreção com umedecimento das pálpebras, pelos e área considerável ao redor do olho	

Tabela 1. Classificação inicial do produto.

CLASSE	FAIXA (Quantificação das lesões)	CLASSIFICAÇÃO
I	0,0 a 14,9	Produto não-irritante (NI)
II	15,0 a 24,9	Produto levemente irritante (IL)
III	25,0 a 49,9	Produto irritante moderado (IM)
IV	50,0 a 79,9	Produto irritante severo (IS)
V	80,0 a 110,0	Produto irritante máximo (IMax)

ETAPA II – Classificação final do potencial de irritabilidade ocular

Esta etapa foi utilizada para confirmar ou alterar a classificação da amostra ou substância teste encontrada da etapa I. Para tal, fez-se uso da **tabela 2**, referente à classificação final do produto.

Tabela 2. Classificação final do potencial de irritabilidade ocular de um produto.

Classificação	Confirmação da classificação inicial
Não irritante (classe I)	$M_{24h} < 2,4$ – classe I; se $M_{24h} > 2,4$ ir para classe II
Irritante leve (classe II)	(1) $M_{48h} \leq 2,4$, classe II; se $M_{48h} > 2,4$, ir para o item (2) (2) $M_{72h} \leq 2,4$, classe II; se $M_{72h} > 2,4$, ir para classe III
Irritante moderado (classe III)	(1) $M_{7d} \leq 20$, ir para o item (2); se $M_{7d} > 20$, ir para classe IV (2) $L_{7d} \leq 10$ em pelo menos 3 animais, classe III; se $L_{7d} > 30$ em pelo menos 1 animal, classe IV
Irritante severo (classe IV)	(1) $M_{7d} \leq 40$, ir para o item (2); se $M_{7d} > 40$, ir para classe V (2) $L_{7d} \leq 30$ em pelo menos 3 animais, classe IV; se $L_{7d} > 60$ em pelo menos 1 animal, classe V
Irritante máximo (classe V)	(1) $M_{7d} > 40$, ir para o item (2) (2) $L_{7d} > 60$ em pelo menos 1 animal, classe V

*M = média; h = horas; d = dias; L = leitura

APÊNDICE A - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO: ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR – MÉTODO HET-CAM

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

TÍTULO: ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR – MÉTODO HET-CAM

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de Aplicação
3. Siglas
4. Biossegurança
5. Procedimentos Gerais
6. Procedimentos específicos
7. Resultados
8. Controle dos dados
9. Bibliografia
10. Anexos
 - A. Formulário de controle de recebimento e incubação dos ovos
 - B. Formulário de registro - HET-CAM

1. OBJETIVO

Este Procedimento Operacional Padronizado (POP) tem como objetivo fixar condições, padronizar, definir e estabelecer regras e recomendações para realização do Ensaio de Irritação Ocular – HET-CAM, produzido pela exposição tópica de uma substância ou produto através da observação e quantificação de reações que possam surgir na membrana coriolantóide de ovo embrionado de galinha. A metodologia empregada foi baseada nas diretrizes estabelecidas por França (1996) e protocolo 47 da INVITTOX (1992)

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se a utilização no Ensaio de Irritação Ocular – método HET-CAM para detectar e avaliar o potencial irritante de qualquer substância ou produto que possa entrar em contato com o olho do homem.

O HET-CAM é um método alternativo aos ensaios em coelhos, para avaliar o potencial irritante de substâncias ou produtos. O princípio baseia-se na observação, por uma pessoa com experiência no método, dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e de coagulação) que podem ocorrer dentro de 5 min após a aplicação do produto químico, puro ou diluído, na membrana corioalantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação.

A CAM é um tecido completo contendo um sistema vascular (veias e artérias, capilares). Responde a lesão com um processo inflamatório semelhante ao que seria observado no tecido da conjuntiva de olho de coelho albino.

Utilizar como parte integrante de uma bateria de métodos “in vitro”, integrando os procedimentos da estratégia “Bottom-Up” (SCOTT et al, 2010).

3. SIGLAS

CAM – Membrana Corioalantoide

HET-CAM – Ensaio da membrana corioalantoide de ovo de galinha (*Hens Egg Test - Chorion Allantoic Membrane*)

POP - Procedimento Operacional Padronizado

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SPF – Livre de Patogênico Específico (Specific Patogenic Free)

4. BIOSSEGURANÇA

- Utilizar jaleco, luvas e máscaras;
- Limpar bancadas e equipamentos com álcool etílico a 70%.

5. PROCEDIMENTOS GERAIS

5.1. Materiais e Equipamentos

- Ovos de galinha da raça White Leghorn, livres de patógenos específicos (SPF), embrionários com peso entre 50 e 75 g na recepção dos mesmos.

- Incubadora com um sistema giratório automático com condições controladas de temperatura ($37,8 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa (50-60%)
- Pinça de iris curva
- Agulha lanceolada
- Tesoura ponta redonda
- Banho de água a $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Cuba de aço inox
- Seringas de 1 mL a 5 mL
- Micropipeta 1000 μL
- Computador com programa específico (*ISCapture Imaging Application 86x - TUCSEN[®]*)
- Lupa estereoscopia (BEL[®] Photonics – LED-60T)
- Câmera (TUCSEN[®] – USB2.0 HSeries modelo ISH500)
- Solução de cloreto de sódio a 0,9%
- Água (para injeção)
- Suporte para ovo
- Placa de Petri
- Fita crepe

5.2. Transporte dos Ovos

Controlar as condições para o transporte de modo a evitar qualquer dano inesperado no processo de incubação. Manter os ovos durante todo transporte entre 5°C e 12°C .

5.3. Recepção dos Ovos

Considerar como dia zero a recepção dos ovos. Pesar e observar os ovos um por um. Eliminar ovos rachados ou quebrados.

5.4. Incubação dos Ovos

Identificar os ovos individualmente com um lápis e colocar na incubadora com condições controladas de temperatura ($37,8^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (50 a 60%) e anotar diariamente. A rotação dos mesmos se dá pelo menos uma vez a cada hora. No nono dia (dia 9), suspender a rotação e colocar os ovos na posição vertical com a bolsa de ar voltada para cima.

5.5. Ovosopia

No 10º dia de incubação (dia 10), retirar os ovos da incubadora e colocar sob luminária com lâmpada de luz fria. Eliminar os ovos defeituosos (imagem que não corresponde à fase esperada do desenvolvimento do embrião) e colocar os ovos selecionados no suporte com a bolsa de ar voltada para cima.

6. PROCEDIMENTOS ESPECÍFICOS

Realizar todas as etapas do ensaio sob uma Lupa estereoscópica (BEL® Photonics – LED-60T) e câmera (TUCSEN® – USB2.0 HSeries modelo ISH500) acoplados a um computador com um programa (*ISCapture Imaging Application 86x* - TUCSEN®), gravar as imagens por cinco minutos, ou seja, durante todo o ensaio.

Em cada ovo selecionado colocar fita crepe em toda volta da câmara de ar para facilitar o corte. Perfurar na região superior da câmara de ar (com uma agulha lanceolada), com uma tesoura sem ponta cortar em volta da câmara de ar até o limite da membrana da casca.

Umedecer toda a superfície da membrana da casca com ± 2 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%, aquecido a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (banho de água). Eliminar o excesso de solução inclinando o ovo e remover a membrana da casca delicadamente com uma pinça, a fim de acessar a membrana corioalantoide.

Rejeitar qualquer ovo cuja membrana corioalantoica esteja danificada (presença de hemorragia e de qualquer outra lesão).

Colocar cuidadosamente 300 μL da substância teste (diluída ou não) diretamente na CAM com uma seringa (1 mL) ou uma micropipeta. No caso de substâncias sólidas ou semi-sólidas, aplicar 0,1 g na CAM, se necessário diluir devidamente. Aquecer o item de teste a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes do uso (exceto itens de teste sólidos e semi-sólidos ou quando contém ingredientes voláteis).

Ativar o programa no computador imediatamente após a aplicação da substância teste. Observar os possíveis fenômenos de irritação durante cinco minutos de acordo com o processo descrito no item seguinte. Anotar o tempo exato de surgimento de cada fenômeno. Testar a substância teste (ou a sua diluição) em quatro ovos. No final do estudo, congelar os ovos a -20°C .

6.1. Procedimento de leitura

Observar a gravação posteriormente e registrar os fenômenos em segundos de acordo com a velocidade com que o dano ocorre: hiperemia, hemorragia, coagulação/opacidade.

Hiperemia/Congestão

Capilares que não eram visíveis antes da adição do produto tornam-se visíveis ao passo que os capilares visíveis dilatam-se e tornam-se mais vermelhos. Esse fenômeno também pode afetar os vasos de maior diâmetro.

Hemorragia

Liberção de sangue dos vasos e/ou capilares, tendo diferentes aparências, e em particular de "couve-flor", em camada, de véu difuso, de pontilhado (sangue escapa seletivamente a partir de diferentes lugares da membrana). Vale a pena notar que:

- A hemorragia pode ter uma vida curta característica; no entanto, deve ser levada em conta,
- A observação, durante os primeiros 30 segundos, de uma hemorragia massiva requer levar em conta a hiperemia prévia.

Coagulação (trombose/opacidade)

Opacidade:

Aparência, na totalidade ou parte da membrana, de um véu opalescente possivelmente evoluindo para opacidade ou de uma opacidade diretamente.

É necessário verificar se este fenômeno não está relacionado com o comportamento físico-química do produto em meio aquoso (por exemplo, a formação de um colóide, um precipitado).

Trombose:

Ruptura do fluxo sanguíneo nos vasos, resultando em uma aparência segmentada (alternância entre constrições e áreas mais ou menos escuras turgescerentes).

Vale a pena notar que as observações não devem levar em conta as mudanças que ocorrem em capilares.

7. RESULTADOS

Observar os fenômenos e quantificar de acordo com a **Tabela 1**, de acordo com o tempo de aparecimento:

Tabela 1. Graduação dos fenômenos de acordo com o aparecimento

Fenômeno	Tempo		
	T ≤ 30 s	30 s < T ≤ 2 min	2 min < T ≤ 5 min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Contar apenas uma vez cada fenômeno observado, quando ele ocorre.

Pontuar cada ovo com a soma das notas de hiperemia, hemorragia e coagulação.

Pontuar a substância teste com a média aritmética das pontuações obtidas em quatro ovos, arredondar para uma casa decimal.

O potencial irritante da substância teste (diluída ou não) de acordo com a categoria do produto é dado pela escala de acordo com a **Tabela 2**.

Tabela 2. Classificação final

Média da Pontuação	Classificação
0,0 a 0,9	Não Irritante (NI)
1,0 a 4,9	Irritante Leve (IL)
5,0 a 8,9	Irritante Moderado (IM)
9,0 a 21,0	Irritante Severo (IS)

8. CONTROLE DO ENSAIO E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Realizar os controles nas mesmas condições da substância teste, antes do início de cada série de testes (um controle por dia de experimento), e tem como objetivo verificar a qualidade dos ovos. Realizar em quatro ovos do mesmo lote do que os ovos utilizados no ensaio.

8.1 Controle negativo

Solução de NaCl a 0,9% a 37°C ± 1°C.

Obter a pontuação entre 0,0 e 3,0.

8.2 Controle positivo

Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) diluído a 1% (Sigma) a 37°C ± 1 ° C.

Obter a pontuação entre 10 e 12 (irritante).

9. BIBLIOGRAFIA

ARRÊTÉ du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques. **Journal Officiel de la République Française - JORF**, Paris, n. 300, 26 déc. 1996. 19137-19138.

INVITTOX. 1992. Protocol N° 47: **HET-CAM Test**.

LUEPKE, N. P. E.; KEMPER, F. H. *The HET-CAM test: An alternative to the Draize eye test*. **Food Chem Toxicol** 1986, 24, n ° 6/7, 495-496.

SCOTT, L. et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using bottom-up and top-down approaches. **Toxicology in Vitro**, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.019>. Acesso em: 07 ago. 2018.

SPIELMANN, H., *et al.* Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. **Toxicology in Vitro** 5, p. 539-542, 1991.

SPIELMANN, H. *et al.* Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. **Toxicol. In Vitro**, v. 7 (4), p. 505-510, 1993.

ANEXO A

FORMULÁRIO DE CONTROLE DE RECEBIMENTO E INCUBAÇÃO DOS OVOS							
Número do Lote: _____			Data: __/__/____				
Procedência: _____			Balança: _____				
Quantidade: _____			Analista: _____				
Temperatura de Recebimento: _____							
Identificação do ovo	Peso	Identificação do ovo	Peso	Identificação do ovo	Peso		
1		16		31			
2		17		32			
3		18		33			
4		19		34			
5		20		35			
6		21		36			
7		22		37			
8		23		38			
9		24		39			
10		25		40			
11		26		41			
12		27		42			
13		28		43			
14		29		44			
15		30		45			
INCUBAÇÃO DOS OVOS							
Incubadora: _____							
Dia	Data	Manhã		Responsável	Tarde		Responsável
		Temperatura	Umidade		Temperatura	Umidade	
0							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

ANEXO B

PROTOCOLO DE REGISTRO - HET-CAM							
Data: ___/___/_____			Analista: _____				
Amostra: _____ () Sólida () Líquida							
Equipamento utilizado para dispensar a amostra: () Seringa () Micropipeta				Lote ou Código: _____			
Pontuação							
Fenômeno	Tempo						
	T ≤ 30 seg.	30 seg. < T ≤ 2 min.	2 min. < T ≤ 5 min.				
Hiperemia	5	3	1				
Hemorragia	7	5	3				
Coagulação	9	7	5				
Ovo	Hiperemia		Hemorragia		Coagulação		Índice
	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Σ Notas
1							
2							
3							
4							
							Média:
Classificação: _____							